

**Zellbiologische und biochemische Charakterisierung von  
humanen ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen der Haut sowie deren Wirkung  
auf Leberfunktionen nach hepatischer Transplantation  
in der Maus**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Dr. rer. med.

an der Medizinischen Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von:	Master of Science Ernährungswissenschaften Lysann Tietze
Geburtsdatum / Geburtsort:	04.11.1989, Borna
angefertigt am / in:	Universität Leipzig Universitätsklinikum Leipzig AöR Klinik und Poliklinik für Viszeral-, Transplantations-, Thorax- und Gefäßchirurgie Arbeitsgruppe Angewandte Molekulare Hepatologie
Betreuer:	Prof. Dr. rer. nat. Bruno Christ Dr. rer. med. Sandra Winkler

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 26.06.2018

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis .....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Anatomie und Funktion der Leber.....	1
1.2 Leberregeneration .....	3
1.3 Lebertransplantation.....	4
1.4 Hepatozytentransplantation .....	5
1.5 Zelltherapie mit adulten mesenchymalen Stammzellen .....	6
1.6 ABCB5 <sup>+</sup> Stammzellen der Haut und deren therapeutisches Potential.....	9
2 Zielsetzung der Arbeit .....	12
3 Material und Methoden .....	13
3.1 Zellkulturarbeiten.....	13
3.1.1 Kultivierung von Stammzellen .....	13
3.1.2 Multiple Differenzierung der Stammzellen .....	14
3.1.3 Nachweis der adipogenen Differenzierung .....	17
3.1.4 Nachweis der osteogenen Differenzierung .....	18
3.1.5 Nachweis der chondrogenen Differenzierung .....	19
3.1.6 Nachweis der hepatogenen Differenzierung mittels PAS-Reaktion .....	19
3.1.7 Durchflusszytometrie.....	20
3.1.8 Messung der Harnstoffsyntheserate.....	21
3.1.9 Bestimmung der Enzymaktivität von CYP1A1 und CYP2B1.....	23
3.1.10 Analyse des Sekretoms undifferenzierter und hepatogen differenzierter ABCB5 <sup>+</sup> Stammzellen .....	25
3.1.11 Nachweis undifferenzierter und hepatogen differenzierter ABCB5 <sup>+</sup> Stammzellen <i>in vitro</i> .....	27

3.2 Molekularbiologische Methoden .....	27
3.2.1 RNA-Isolierung und Konzentrationsmessung .....	28
3.2.2 cDNA-Synthese .....	30
3.2.3 Semi-quantitative RT-PCR .....	30
3.2.4 Analyse der PCR-Produkte .....	33
3.3 Tierexperimentelle Arbeiten.....	33
3.3.1 Transplantation von undifferenzierten und differenzierten ABCB5 <sup>+</sup> Stammzellen in immundefiziente Mäuse .....	34
3.3.2 Finale Blut- und Organentnahme .....	36
3.4 Bestimmung von Laborparametern im Blutserum .....	36
3.5 Histologische und Immunhistologische Methoden .....	37
3.5.1 Anfertigung von Paraffinschnitten.....	37
3.5.2 Hämalaun-Eosin Färbung .....	37
3.5.3 Nachweis kollagener Fasern mittels Sirius Red-Färbung .....	38
3.5.4 Nachweis der Zellproliferation durch Ki67 .....	38
3.5.5 Nachweis der undifferenzierten und differenzierten ABCB5 <sup>+</sup> Stammzellen nach Transplantation in immundefiziente Mäuse .....	39
3.5.6 Anfertigung von Kryoschnitten.....	40
3.5.7 Nachweis von Lipiden .....	40
3.5.8 Immunhistochemischer Nachweis von Makrophagen mit dem anti-F4/80- Antikörper .....	40
3.6 Statistische Auswertung .....	41
4 Ergebnisse.....	42
4.1 Zellbiologische und biochemische Charakterisierung der undifferenzierten und differenzierten Parentalstammzellen sowie ABCB5 <sup>+</sup> Stamm-zellen .....	42
4.1.1 Adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung .....	42
4.1.2 Nachweis der hepatogenen Differenzierung.....	43
4.1.3 Expression von Oberflächenmarkern .....	45
4.1.4 Funktioneller Nachweis leberspezifischer Stoffwechselleistungen.....	49

4.1.5 Expression leberspezifischer Gene .....	51
4.2 Analyse des Sekretoms von undifferenzierten und differenzierten ABCB5 <sup>+</sup> Stammzellen .....	55
4.3 Wirkung von undifferenzierten und differenzierten ABCB5 <sup>+</sup> Stammzellen im xenogenen Transplantationsmodell .....	58
4.3.1 Nachweis von undifferenzierten und differenzierten ABCB5 <sup>+</sup> Stammzellen in der Empfängerleber .....	59
4.3.2 Die transplantierten Stammzellen verursachten keine offensichtliche Leberschädigung .....	61
4.3.3 Einfluss der ABCB5 <sup>+</sup> Stammzellen auf den Leberstoffwechsel.....	66
5 Diskussion .....	78
5.1 ABCB5 <sup>+</sup> Stammzellen lassen sich mit dem angewendeten Protokoll nicht in hepatozytäre Zellen differenzieren.....	78
5.2 Undifferenzierte und differenzierte ABCB5 <sup>+</sup> Stammzellen sezernieren hepatotrope Faktoren .....	81
5.3 Die hepatische Applikation von ABCB5 <sup>+</sup> Stammzellen hat keine pathophysiologischen Einflüsse auf die Leberregeneration und -funktion.....	86
5.5 Schlussfolgerung.....	91
Zusammenfassung der Arbeit .....	92
Literaturverzeichnis .....	95
Anlagen.....	105
Selbstständigkeitserklärung.....	113
Lebenslauf .....	114
Publikationen.....	115
Danksagung .....	116

## Abkürzungsverzeichnis

ABCB1	<i>ATP-binding cassette, subfamily B, member 1</i>
ABCB5	<i>ATP-binding cassette, subfamily B, member 5</i>
ABCG2	<i>ATP-binding cassette, subfamily G, member 2</i>
ABC-Transporter	<i>adenosine triphosphate-binding Cassette Transporter</i>
ALT	Alanin-Aminotransferase
AP	alkalische Phosphatase
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
B2M	β2-Mikroglobulin
BAFF	<i>B-cell activating factor</i>
BCIP	5-Bromo-4-chlor-3-indoxylphosphat
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BSA	bovines Serumalbumin
Casp	Caspase
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CK	Cytokeratin
CPS I	Carbamoylphosphat-Synthetase I
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat
CycA	Cyclophilin A
CYP1A1	Cytochrom P450 1A1
CYP2B1	Cytochrom P450 2B1
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC-H <sub>2</sub> O	Diethylpyrocarbonat-H <sub>2</sub> O
DKK-1	Dickkopf-1
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPPIV	Dipeptidylpeptidase IV
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EM6F	Erhaltungsmedium
EMMPRIN	<i>extracellular matrix metalloproteinase inducer</i>

ENA-78	<i>epithelial-derived neutrophil-activating peptide 78</i>
EROD	Ethoxyresorufin-O-deethylase
FABP1	<i>fatty acid-binding protein 1</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKSi	inaktiviertes fetales Kälberserum
Flt-3 Ligand	<i>fms-related tyrosine kinase 3 Ligand</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
G-CSF	<i>granulocyte-colony stimulating factor</i>
GDF-15	<i>growth/differentiation factor 15</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GRO- $\alpha$	<i>growth-regulated <math>\alpha</math> protein</i>
GS	Glutaminsynthetase
$\gamma$ -GT	$\gamma$ -Glutamyltransferase
H <sub>2</sub> O	Wasser
HepPar1	<i>hepatocyte paraffin 1</i>
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HGM	<i>hepatocyte growth medium</i>
HHMM	humanes Heptozytenwachstumsmedium
HLA-DR	<i>human leukocyte antigen-antigen D related</i>
HNF4	<i>hepatocyte nuclear factor 4</i>
HRG	5 %iges humanes Serumalbumin (49,5 Vol.-%), Ringer-Laktat (49,5 Vol.-%); 4 %ige Glucose (1 Vol.-%)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IGFBP	<i>insulin-like growth factor-binding protein</i>
IL	Interleukin
IP-10	<i>Interferon-<math>\gamma</math>-induced protein 10</i>
IPP	Immunpräzipitationspuffer
I-TAC	<i>Interferon-inducible T-cell <math>\alpha</math></i>
ITS	Insulin-Transferrin-Selenit
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genom</i>
LCS	limbale Stammzellen
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>

MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MDR1	<i>multidrug resistance protein 1</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MIF	<i>macrophage migration inhibitory factor</i>
MIG	<i>monokine induced by Interferon-<math>\gamma</math></i>
MIP	<i>macrophage inflammatory proteins</i>
MMP-9	<i>matrix metalloproteinase 9</i>
MnSO <sub>4</sub>	Mangan(II)-sulfat
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MSC	<i>mesenchymal stem cells</i>
NaCl	Natriumchlorid
NBT	<i>nitroblue tetrazolium</i>
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
PAS	<i>periodic acid schiff</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PE	Phycoerythrin
PET	Polyethylenterephthalat
PF4	<i>platelet factor 4</i>
Pfp-Gen	Perforin-Gen
PGA	Polymerol der Glykolsäure
PPAR $\alpha$	<i>peroxisome proliferator-activated receptor <math>\alpha</math></i>
PROD	Pentoxeresorufin-O-dealkylase
pTGF- $\beta$ 1	<i>platelet-derived transforming growth factor <math>\beta</math> 1</i>
Rag2-Gen	<i>recombination activating gene 2</i>
RAGE	<i>receptor for advanced glycation endproducts</i>
RANTES	<i>regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>
RBP4	<i>retinol binding protein 4</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RPE	<i>retinal pigment epithelial cells</i>
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
$\alpha$ -SMA	<i><math>\alpha</math>-smooth muscle actin</i>
SDF-1 $\alpha$	<i>stromal cell-derived factor-1<math>\alpha</math></i>
SHBG	<i>sex hormone-binding globulin</i>
SREBP1C	<i>sterol regulatory element-binding protein 1C</i>
SSC	<i>side scatter</i>

TARC	<i>thymus and activation-regulated chemokine</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TfR	<i>transferrin receptor</i>
TGF- $\alpha$	<i>transforming growth factor-<math>\alpha</math></i>
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
TIMP1	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases 1</i>
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
uPAR	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
ZnCl <sub>2</sub>	Zinkchlorid
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	Zinksulfat-Heptahydrat



## 1 Einleitung

### 1.1 Anatomie und Funktion der Leber

Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan des Organismus. Mit 1,0-1,5 kg ist die humane Leber eines der größten Organe (Sobotta & Welsch 2003). Die Zellmasse der Leber besteht zu 60-70 % aus Leberparenchymzellen, den Hepatozyten, und zu einem kleineren Teil aus Nichtparenchymzellen. Dazu gehören unter anderem die Cholangiozyten, Kupfferzellen (leberresidente Makrophagen), die hepatischen Sternzellen (Ito-Zellen), Endothelzellen, Pit-Zellen (leberspezifische Natürliche Killerzellen) und Progenitorzellen (Löffler *et al.* 2007). Abbildung 1 stellt die Hepatozyten und ihre Beziehung zu den umliegenden Nichtparenchymzellen dar.

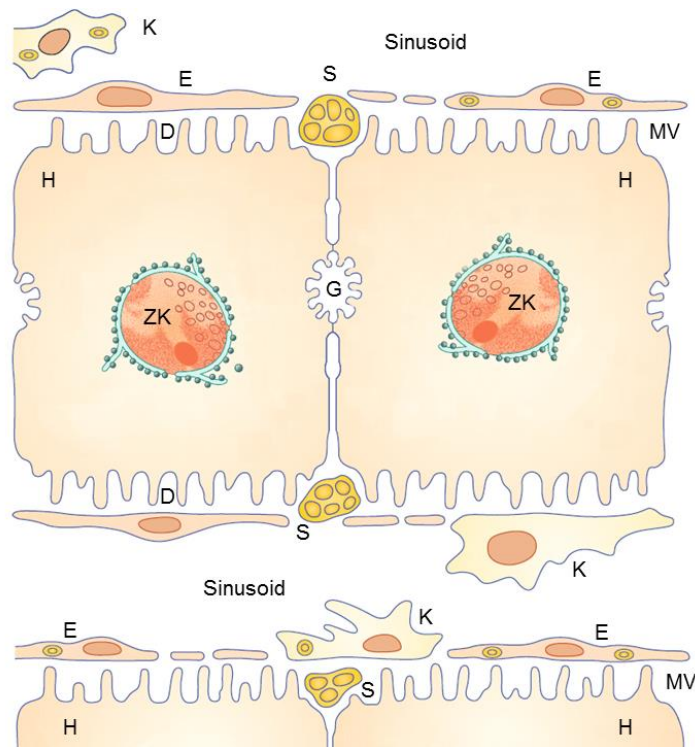


Abbildung 1: Vereinfachte Übersicht der Hepatozyten und ihre Beziehung zu den umliegenden Nichtparenchymzellen.

C, Gallekanälchen; D, Disse-Raum; E, Endothelzelle; H, Hepatozyt; K, Kupfferzelle; MV, Mikrovilli; S, Sternzellen; Z, Zellkern (Abbildung modifiziert nach Löffler *et al.* 2007)

Versorgt wird die Leber über zwei zuführende Gefäße (*Ateria hepatica propria*, *Vena portae*), die an der Leberpforte in das Organ eintreten (Sobotta & Welsch 2003). Der Gallengang (*Ductus hepaticus*) verläuft parallel mit den intrahepatischen Ästen von Leberfortader und Leberarterie.

Die Gallenkanälchen (*Canaliculi*) stellen erweiterte Interzellularräume dar und werden durch die apikalen Membranen benachbarter Hepatozyten gebildet. In der apikalen Membran sind verschiedene Transportproteine lokalisiert, die Stoffwechselendprodukte mit der Gallenflüssigkeit in die Gallenkanälchen sezernieren.

Den Übergang zwischen den Gallenkanälchen und den interlobulären Gallengängen (*Ductuli biliferi*) bilden die Hering-Kanäle. Die Flussrichtung der Galle ist dabei entgegen des Blutstroms gerichtet. Das venöse Blut verlässt über die Lebervenen (*V. hepaticae*) das Organ. Die terminalen Zweige der beiden zuführenden Gefäße und die proximalen Verzweigungen der Zentralvenen bilden die Lebersinusoiden, die zwischen den Hepatozytenbälkchen verlaufen (Baumhoer *et al.* 2003). Sie besitzen ein diskontinuierliches (gefenstertes) Endothel und sind durch den Disse-Raum von den Hepatozytenbälkchen getrennt. Zum Stoffaustausch zwischen den blutführenden Sinusoiden und den Hepatozyten müssen Substanzen den Disse-Raum per Diffusion überwinden.

Die Leber übernimmt zentrale Funktionen im Stoffwechsel der Kohlenhydrate, Proteine und Lipide. Sie spielt u.a. eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der Glucosehomöostase im Gesamtorganismus, um andere Organe mit Glucose als Energiesubstrat zu versorgen. Bei Bedarf schüttet die Leber durch den Abbau von Glykogen und durch Neusynthese Glucose aus. Durch Gluconeogenese kann bei einem erschöpften Glykogen-Speicher Glucose aus Lactat, Glycerol oder den Kohlenstoff-Gerüsten von Aminosäuren aufgebaut werden (Koolman & Röhm 2009; Sobotta & Welsch 2003). Auch zur Lipidhomöostase trägt die Leber maßgeblich bei. Triglyceride werden in der Leber aus  $\alpha$ -Glycerophosphat und Acyl-CoA synthetisiert, die in Form von Lipoproteinen ans Blut abgegeben werden können (Löffler *et al.* 2007). Neben Triglyceriden transportieren Lipoproteine auch das in der Leber synthetisierte Cholesterol. Überschüssiges Cholesterol wird in Gallensäuren umgewandelt und mit der Galle ausgeschieden (Koolman & Röhm 2009). Hepatozyten synthetisieren außerdem zahlreiche Plasmaproteine, wie z.B. Albumin, Gerinnungsfaktoren, Globuline und hormonale Faktoren, z.B. Angiotensinogen (Sobotta & Welsch 2003). Neben der Bildung von Plasmaproteinen synthetisiert die Leber Harnstoff zur Ammoniakentgiftung (Sobotta & Welsch 2003). Ein weiteres funktionelles Merkmal ist die Metabolisierung von endo- und exogenen Substanzen. Das Ziel ist es, durch Umwandlungs- und Konjugationsreaktionen die auszuscheidenden Stoffe zu inaktivieren und in stärker polare Metabolite zu überführen (Koolman & Röhm 2009; Sobotta & Welsch 2003). Dazu gehören u.a. die Metabolisierung von Steroidhormonen, Alkohol, Drogen (z.B. Heroin) und auch Medikamente wie z.B. Paracetamol (Sobotta & Welsch 2003).

## 1.2 Leberregeneration

Die Leber weist eine ausgeprägte Regenerationsfähigkeit auf. Schon 1931 zeigten Higgins und Anderson in ihrer Studie an Ratten, dass sich die gesunde Leber nach einer 70 %igen Hepatektomie innerhalb von 7–10 Tagen vollständig regeneriert (Court *et al.* 2002). Je nach Art und Ausmaß der Schädigung sind verschiedene Zellkompartimente beteiligt. In der Regel werden Schädigungen durch mitotische Teilung der Hepatozyten selbst regeneriert (Fausto 2004). Erst wenn die Teilungsfähigkeit der Hepatozyten bei schweren Leberschädigungen eingeschränkt ist, proliferieren aus den Hering-Kanälen stammende Progenitorzellen und differenzieren sowohl in Hepatozyten als auch Cholangiozyten (Löffler *et al.* 2007; Lüllmann-Rauch & Asan 2015; Sobotta & Welsch 2003). Bei bestimmten genetischen Stoffwechselerkrankungen ist das Regenerationspotential der Leber aufgrund der Akkumulation von hepatotoxischen Metaboliten oder falsch gefalteten Proteinen stark eingeschränkt (Fox & Roy-Chowdhury 2004; Hermann 2012; Ulvik 2015). Zu letzteren gehört u.a. der  $\alpha_1$ -Antitrypsin-Mangel (Prävalenz 1:2000 – 1:5000) (Fregonese & Stolk 2008). Eine erblich bedingte Lebererkrankung, die sich aufgrund des falsch gefalteten Proteins und dessen Akkumulation in Hepatozyten durch einen geringen  $\alpha_1$ -Antitrypsin Spiegel im Serum äußert.  $\alpha_1$ -Antitrypsin ist einer der wichtigsten Proteaseinhibitoren, so dass der Mangel zu einer verstärkten Aktivität von u.a. Trypsin und Elastase führt, der insbesondere bei homozygoten Patienten in der Lunge zu erheblichen Epithelschädigungen führen kann (Fregonese & Stolk 2008). In der Leber führt die Akkumulation des nicht-funktionellen Proteins im endoplasmatischen Retikulum letztlich zur Leberzellschädigung, die im chronischen Verlauf ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung einer Leberzirrhose aufweist. Auch die erbliche Form der Hämochromatose führt infolge der vermehrten Eisenaufnahme in den Hepatozyten zur Akkumulation von Eisen in der Leber (Ulvik 2015). Sie ist gekennzeichnet durch eine gesteigerte intestinale Absorption von Eisen. Die starke Akkumulation von Eisen führt zu irreversiblen Leberschädigungen, die langfristig zum Leberversagen führen (Ulvik 2015). Eine Lebertransplantation ist von Vorteil, da sich der Hepcidinspiegel, ein Protein das die Eisenaufnahme und dadurch die Akkumulation von Eisen hemmt, normalisiert (Ulvik 2015). Eine eher seltene, dennoch wichtige genetische Erkrankung ist das Crigler-Najjar-Syndrom (Defekt der Bilirubin-UPD-Glucuronosyltransferase, Prävalenz < 1:1.000.000). Durch den Enzymdefekt wird von Geburt an unkonjugiertes Bilirubin gebildet, das aufgrund der fehlenden Ausscheidung in den Hepatozyten akkumuliert. Durch die damit einhergehende Zellschädigung gelangt Bilirubin in die Zirkulation (Hyperbilirubinämie) und führt zu neurologischen Störungen sowie einem Kernikterus (Fox & Roy-Chowdhury 2004). Eine Lebertransplantation ist die einzige kurative Therapieoption.

Transplantationen der gesamten Leber nach postmortalen Leberspende oder auch eines Teils der Leber nach Leberlebendspende sind daher effektive Methoden zur Behandlung von Leberversagen und leberspezifischen metabolischen Störungen. Oft findet sich jedoch kein geeignetes Transplantat, was zu langen Wartezeiten auf der Warteliste und der damit verbundenen erhöhten Mortalität von Patienten führt (Fox & Roy-Chowdhury 2004).

### 1.3 Lebertransplantation

In Deutschland befinden sich derzeit über 10.000 Patienten auf der aktiven Warteliste für ein geeignetes Spenderorgan der 50 Transplantationszentren (Deutsche Stiftung Organtransplantation, Stand 26.06.2017). Etwa 1.277 Patienten warten auf eine Leber, darunter 44 Patienten die ein weiteres Organ, wie z.B. eine Niere benötigen (Deutsche Stiftung Organtransplantation, Eurotransplant, Stand 26.05.2017). Abbildung 2 stellt die Anzahl der Neuanmeldungen im Vergleich zu den durchgeführten Lebertransplantationen über den Zeitraum 2007 bis 2016 dar. Neben Erstanmeldungen kommt es auch zu Wiederholungsanmeldungen, da einige Patienten zuvor aufgrund ihres schlechten Allgemeinzustandes von der Warteliste genommen werden mussten, dann aber wieder gelistet wurden oder eine Re-Transplantation nach primärem Organversagen erforderlich wurde.

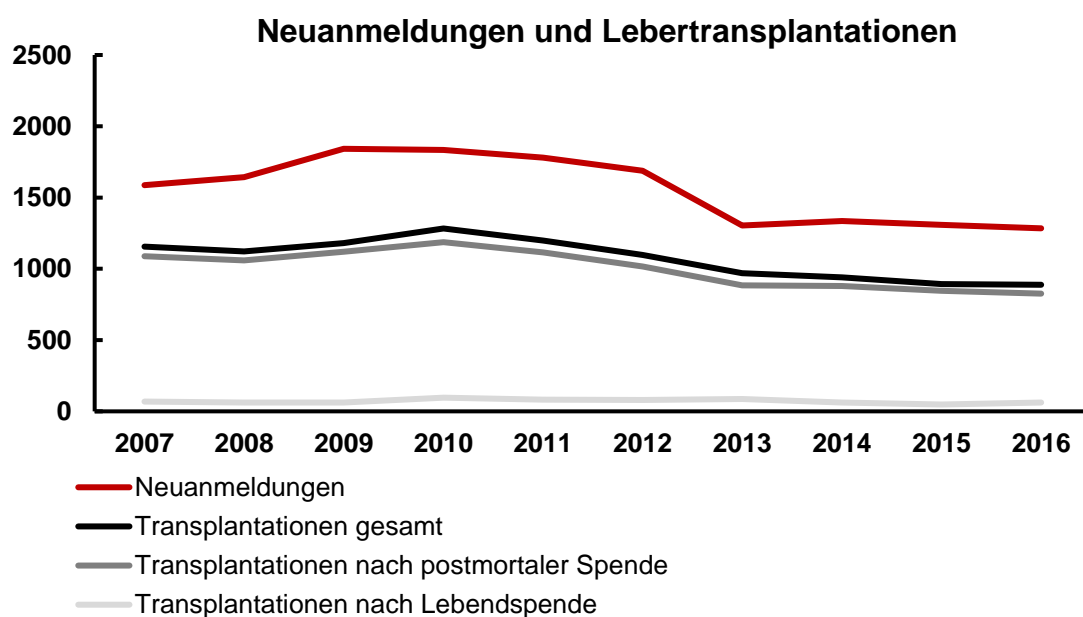


Abbildung 2: Neuanmeldungen und Lebertransplantationen. Neuanmeldungen ohne Wiederholungsanmeldung; Quelle: Eurotransplant, Stand 07.03.2017

Andere Patienten sterben, während sie auf der Warteliste stehen, weil kein Organ rechtzeitig für sie zur Verfügung steht. 2016 wurden in Deutschland insgesamt 826 Lebertransplantationen nach postmortaler Organspende und 62 nach einer Lebendspende durchgeführt (Eurotransplant, Stand 26.05.2017). Gründe für die Aufnahme auf die Warteliste und eine Lebertransplantation sind vielfältig. Erst wenn der Patient unter einer lebensgefährlichen, nicht rückbildungsfähigen und fortschreitenden Lebererkrankung leidet, wird eine Transplantation in Betracht gezogen. Zu diesen Erkrankungen zählen die Leberzirrhose, cholestatische Lebererkrankungen, genetische und metabolische Erkrankungen, akutes Leberversagen, bösartige Lebertumore oder andere Lebererkrankungen (Deutsche Stiftung Organtransplantation, Stand 26.06.2017).

Neben der *post mortem*-Organspende besteht auch die Möglichkeit der Lebendspende. Das Transplantationsgesetz schreibt vor, dass eine Lebendspende nur zulässig ist, wenn kein postmortal gespendetes Organ für den Empfänger zur Verfügung steht. Dies beruht darauf, dass bei Teilleber-Lebendspenden neben dem normalen Operationsrisiko das Risiko für den Spender nach der Teilleberresektion aufgrund von möglichen Komplikationen in der Gefäßversorgung sogar höher als für den Empfänger ist. Es ist daher der Nutzen für den Empfänger gut gegen das Risiko des Spenders abzuwägen (Deutsche Stiftung Organtransplantation, Stand 26.06.2017; Salame *et al.* 2002).

### 1.4 Hepatozytentransplantation

Durch den Mangel an geeigneten Transplantaten stellt sich die Frage nach weiteren Möglichkeiten zur Behandlung von akuten und chronischen Lebererkrankungen. Ein Konzept ist die Hepatozytentransplantation. Sie beruht auf der Annahme, dass primäre Hepatozyten als kleinste funktionelle Einheiten der Leber im Falle einer akuten oder chronischen Schädigung die metabolischen Funktionen übernehmen könnten (Christ *et al.* 2015). Tatsächlich konnte in einigen Tierstudien die Validität des Konzeptes der Hepatozytentransplantation unter verschiedenen Bedingungen gezeigt werden. Unter anderem durch akute Intoxikation mit Thioacetamid, Acetaminophen, Tetrachlormethan nach partieller Leberresektion, sowie unter chronischen Bedingungen z.B. monogenetische metabolische Lebererkrankungen oder Zirrhose (Christ *et al.* 2015). Auch in Humanstudien konnten Erfolge verzeichnet werden. 1998 zeigten Fox *et al.*, dass das Crigler-Najjar Syndrom Typ I erfolgreich mit primären Hepatozyten behandelt werden konnte. Als Alternative zur Organspende erhielt die Patientin über 15 Stunden eine Infusion von  $7,5 \times 10^9$  Hepatozyten, welche zuvor *post mortem* aus einer Spenderleber gewonnen wurden waren.

Die transplantierten Hepatozyten überlebten für mehr als 11 Monate und korrigierten teilweise die leberspezifische metabolische Störung, so dass sich die Zeit der notwendigen Phototherapie halbierte und somit ein signifikanter Zuwachs an Lebensqualität erreicht wurde. Das geringere Operationsrisiko, das geringere Risiko der Transplantatabstoßung und ebenso die geringeren Kosten der Hepatozytentransplantation im Vergleich zur Lebertransplantation, stellen einen großen Vorteil für betroffene Patienten dar (Fox *et al.* 1998). Doch die Anzahl der Lebern, die für die Isolierung von Hepatozyten gut geeignet wären, ist marginal. Da diese für die Organtransplantation verwendet werden und demzufolge nicht zur Organtransplantation geeignete Lebern zur Verfügung stehen. Aus diesem Grund lassen sich nur Hepatozyten von schlechter Qualität isolieren, die durch das lagerungsbedingte Einfrieren und Auftauen weiter beeinträchtigt werden und schließlich zu massivem Verlust der Viabilität der Hepatozyten führt (Christ *et al.* 2015). Dies hat zur Folge, dass die Integrationsfähigkeit und die Proliferation im Empfängerparenchym unzureichend ist (Christ *et al.* 2015). Daher hat die Hepatozytentransplantation bisher keinen klinischen Durchbruch erzielt. Dennoch können die gewonnenen Erkenntnisse für alternative Therapien, insbesondere im Bereich der regenerativen Medizin, eingesetzt werden. Eine dieser Alternativen ist z.B. die Stammzelltherapie bei Lebererkrankungen (Christ *et al.* 2015). Ebenso wie bei der Hepatozytentransplantation, geht man davon aus, dass auch bei der Transplantation von adulten Stammzellen nur der Ersatz von ca. 1–5% der Leberzellmasse ausreicht, um einen genetischen Defekt korrigieren zu können (Christ & Dollinger 2011). Basierend auf umfangreichen Studien in Tiermodellen, gelten heute mesenchymale Stammzellen als vielversprechend zur Behandlung von akuten und chronischen Lebererkrankungen (*mesenchymal stem cells*, MSC) (Christ *et al.* 2015; Nicolas *et al.* 2016).

### 1.5 Zelltherapie mit adulten mesenchymalen Stammzellen

Adulte mesenchymale Stammzellen (MSC) sind aufgrund ihrer einfachen Verfügbarkeit und geringer ethischer Bedenken besonders gut für den Einsatz in der regenerativen Medizin geeignet (Christ *et al.* 2015; Murphy *et al.* 2013; Stoltz *et al.* 2015; Uccelli *et al.* 2008). Sie können aus unterschiedlichen Geweben, insbesondere Knochenmark und Fettgewebe, gewonnen und in hepatozytäre Zellen differenziert werden und gelten daher neben der Hepatozytentransplantation als eine vielversprechende Alternative zur Lebertransplantation (Nicolas *et al.* 2016).

Erstmals beschrieben wurden mesenchymale Stammzellen durch Friedenstein *et al.* im Jahr 1976. Ursprünglich im Knochenmark identifiziert, handelt es sich um heterogene

plastikadhärente Zellen, mit einer fibroblastenartigen Morphologie, welche *in vitro* Kolonien bilden und sich adipogen, chondrogen und osteogen differenzieren lassen (Friedenstein *et al.* 1976; Uccelli *et al.* 2008). Seither konnten mesenchymale Stammzellen, neben dem Knochenmark, aus vielen anderen Geweben wie z.B. Fettgewebe, Lunge, Leber, Zahnpulpa, Skelettmuskel oder dem Nabelschnurblut isoliert werden (Kobolak *et al.* 2016).

Mit dem zunehmenden biologischen und klinischen Interesse an mesenchymalen Stammzellen ist auch die Anzahl an Studien stetig gestiegen. Durch die unterschiedlichen Methoden zur Isolierung aus verschiedenen Geweben und unterschiedlichen Kultivierungs- und Propagationsbedingungen entstand die Notwendigkeit, Kriterien zur einheitlichen Charakterisierung der MSC zu definieren. Aus diesem Grund legte die *International Society for Cellular Therapy* (Dominici *et al.* 2006) zur Klassifizierung von mesenchymalen Stammzellen folgende Kriterien fest:

Tabelle 1: Kriterien zur Definition mesenchymaler Stammzellen

---

1 **Plastikadhärenz** unter standardisierten Kulturbedingungen

2 **Oberflächenmarkerprofil**

Positiv ( $\geq 95\%$ )	Negativ ( $\leq 2\%$ )
CD105	CD45
CD73	CD34
CD90	CD14 oder CD11b
	CD79a oder CD19
	HLA-DR

3 ***In vitro* Differenzierung:** Adipozyten, Chondroblasten, Osteoblasten

---

CD, *cluster of differentiation*; HLA-DR, *human leukocyte antigen-antigen D related* (Abbildung nach Dominici *et al.* 2006)

Studien konnten zeigen, dass sich mesenchymale Stammzellen nicht nur in Adipozyten, Chondroblasten und Osteoblasten differenzieren lassen, sondern u.a. auch in Hautzellen, Lungenzellen oder neuronale Zellen (Kobolak *et al.* 2016). Es konnte nachgewiesen werden, dass sich mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark *in vitro*, unter der Verwendung von EGF (*epidermal growth factor*) und HGF (*hepatocyte growth factor*), essentielle Wachstumsfaktoren für die Leberregeneration und die Morphogenese von Hepatozyten, auch in hepatozytenähnliche Zellen differenzieren lassen.

Dabei entwickelten die hepatogen differenzierten MSC zunehmend leberspezifische Eigenschaften wie Harnstoff- und Glykogensynthese, die Fähigkeit zum Fremdstoffmetabolismus sowie die Aktivierung von hepatozytenspezifischen Promotoren (Aurich *et al.* 2009). In einem xenogenen Transplantationsmodell zur Leberregeneration wurden hepatogen differenzierte Stammzellen aus Fettgewebe nach einer 30 %igen Hepatektomie transplantiert (Aurich *et al.* 2007; Aurich *et al.* 2009). Es zeigte sich, dass sich hepatogen differenzierte MSC besser in das Empfängergewebe integrierten als undifferenzierte Stammzellen. Die transplantierten Zellen wiesen weitere funktionelle Eigenschaften von Hepatozyten auf, wie z.B. die Expression des hepatozytenspezifischen Antigens HepPar1 (*hepatocyte paraffin 1*), ein Schlüsselenzym des Harnstoffzyklus auch als Carbamoylphosphat-Synthetase I (CPS I) bekannt (Butler *et al.* 2008). Sie exprimierten weitere spezifische Marker wie Albumin, die auf der kanalikulären Membran von Hepatozyten lokalisierte Protease CD26 und das hepatozytenspezifische *gap junction* Protein Connexin 32 (Aurich *et al.* 2007; Aurich *et al.* 2009). Die Studie von Banas *et al.* konnte ebenfalls zeigen, dass nach Applikation von humanen hepatogen differenzierten Stammzellen in die Schwanzvene von CCL<sub>4</sub> Mäusen, diese sich besser integrierten. Es konnten sowohl undifferenzierte als auch hepatogen differenzierte Stammzellen in der Empfängerleber nachgewiesen werden. Jedoch zeigten im Vergleich die undifferenzierten Stammzellen keine typische Hepatozytenmorphologie (Banas *et al.* 2007). In Ratten mit einer durch Dimethylnitrosamin induzierten Leberfibrose konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass MSC sich positiv auf das geschädigte Lebergewebe auswirken können (Kim & Cho 2016). Durch Gentransduktion präparierte HGF sezernierende Stammzellen zeigten dabei einen besseren therapeutischen Effekt als Stammzellen allein. Der Kollagengehalt im Lebergewebe und die Transaminasen (AST, ALT) sanken signifikant. Es zeigte sich eine Reduktion der Fibrose sowie eine Verbesserung von hepatozytenspezifischen Funktionen. Auch hier integrierten sich im Vergleich HGF sezernierende MSC besser (Kim *et al.* 2014).

Sowohl undifferenziert als auch differenziert mesenchymale Stammzellen sezernieren parakrine Botenstoffe wie Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren und stehen im direkten Zell-Zell Kontakt mit dem umliegenden Gewebe (Christ *et al.* 2015).

Beruhend auf ihrer anti-inflammatorischen Wirkung, können MSC sowohl die innate als auch die adaptive Immunabwehr beeinflussen (Bunnell *et al.* 2010; Kim & Cho 2016; Prockop & Youn Oh 2012; Singer & Caplan 2011). In einem inflammatorischen Umfeld mit hohen Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interferon- $\gamma$  Spiegel, wurden MSC aktiviert und entwickelten einen immunsuppressiven Phänotyp (Bernardo & Fibbe 2013).



Durch die Sezernierung von löslichen Faktoren wie Indolamin-2,3-Dioxygenase, Prostaglandin E2, Stickstoffmonoxid, TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ), HGF (*hepatocyte growth factor*) und Hämoxygenase hemmten MSC die Proliferation von T-Lymphozyten und veränderten das Muster ihrer sekretorischen Zytokine (Amorin *et al.* 2014; Bernardo & Fibbe 2013). Auch die Proliferation und Differenzierung von B-Lymphozyten wurde inhibiert (Amorin *et al.* 2014). MSC unterdrückten durch die Sekretion von löslichen Faktoren und direkten Zell-Zell-Kontakt ebenfalls die Proliferation von Natürlichen Killer-(NK-)Zellen sowie die Differenzierung, Reifung und Funktion von dendritischen Zellen (Amorin *et al.* 2014; Sotiropoulou *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2004). Zudem rekrutierten MSC M2 Makrophagen zum Ort des entzündlichen Geschehens und wandelten die pro-inflammatorischen M1 Makrophagen in anti-inflammatorische M2 Makrophagen um (Amorin *et al.* 2014). Neben dieser Wirkung reduzierten MSC die Apoptoserate von Hepatozyten, die wahrscheinlich auf eine Absenkung der TNF- $\alpha$  Spiegel zurück zuführen war (Owen & Newsome 2015). Gleichzeitig wirkten MSC pro-proliferativ und erhöhten bei Leberschädigungen die Regenerationsfähigkeit der Hepatozyten um das Dreifache (van Poll *et al.* 2008). Neben den bereits genannten Eigenschaften wirken MSC also immunmodulatorisch, anti-inflammatorisch, anti-apoptotisch und pro-proliferativ (Block *et al.* 2009; Christ *et al.* 2015; Nicolas *et al.* 2016; Prockop & Youn Oh 2012; Squillaro *et al.* 2016; Uccelli *et al.* 2008).

### **1.6 ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen der Haut und deren therapeutisches Potential**

Auch in der Haut wurden viele Stammzellpopulationen identifiziert und erforscht. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Hauterneuerung, Wundheilung und Homöostase (Wong *et al.* 2012). Ebenso wie Stammzellen aus anderen Geweben, sind sie zur Selbsterneuerung fähig und können sich in unterschiedliche Zelltypen differenzieren. Isoliert wurden die Stammzellen aus allen Hautschichten (Epidermis, Dermis, Subkutis (vgl. Abbildung 3) (Wong *et al.* 2012). Eine interessante und vielversprechende Subpopulation aus der Haut stellen dabei ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen dar, die aus einer Ausgangsstammzellpräparation (Parentalstammzellen) von adulten mesenchymalen Stammzellen selektioniert werden können (Meier *et al.* 2010; Vander Beken *et al.* 2013; Vries *et al.* 2016).

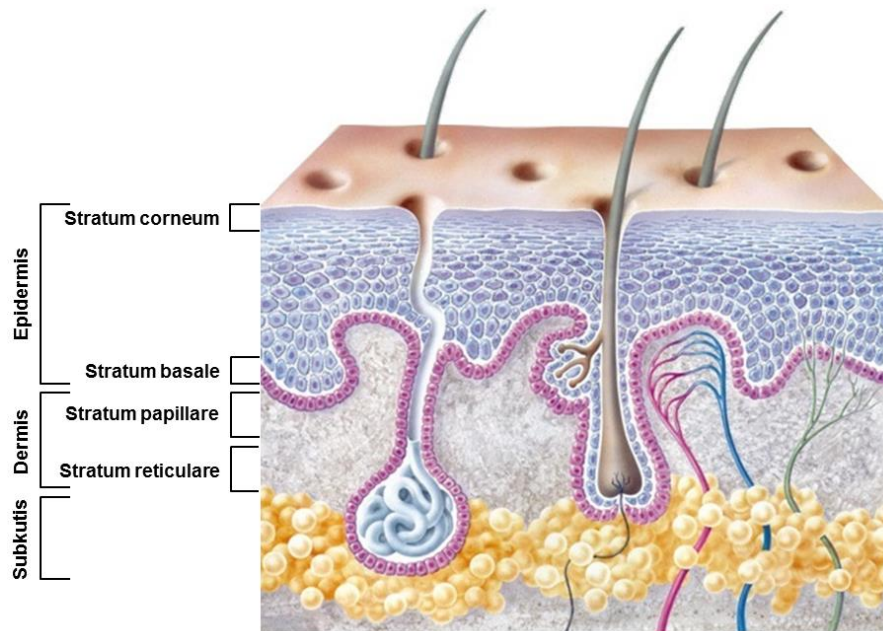


Abbildung 3: Einteilung der Haut in drei Schichten. Aus allen können Stammzellen isoliert werden.

ABC-Transporter (*adenosine triphosphate-binding cassette* Transporter) sind Membranproteine, die unter ATP-Hydrolyse eine Vielzahl an Verbindungen (u.a. Peptide, Cholesterol und in der Leber Gallensäuren) gegen den Konzentrationsgradient aus der Zelle transportieren können (Dean & Allikmets 2001). Eine wichtige Rolle spielen sie bei der Behandlung des malignen Melanoms, da sie als Effluxtransporter Chemotherapeutika aus der Zelle eliminieren und so eine Chemoresistenz von malignen Melanomen bewirken (Chen *et al.* 2009). Der bekannteste ATP-Transporter ist der MDR1-Transporter (*Multidrug Resistance Protein 1*) auch ABCB1-Transporter (*ATP-binding Cassette, subfamily B, member 1*) genannt. Er spielt eine wesentliche Rolle bei der Prävention der Aufnahme von toxischen Verbindungen u.a. im Gehirn, aber auch in Tumorzellen (Borst & Elferink 2002; Dean & Allikmets 2001). Die Transporter ABCB1 und ABCG2 werden zudem auf Stammzellen exprimiert (Chaudhary & Roninson 1991).

Eine weiterer Subtyp ist der ABC-Transporter ABCB5 (*ATP-binding Cassette, subfamily B, member 5*), der ebenfalls zu den *multidrug resistance* Transportern zählt und in verschiedenen Isoformen vorkommt (Chen *et al.* 2005; Frank & Frank 2009). Frank *et al.* konnten erstmals zeigen, dass der ABCB5-Transporter auf CD133<sup>+</sup> Progenitorzellen humaner epidermaler Melanozyten, sowie auf chemoresistenten malignen Melanomen exprimiert wird (Frank *et al.* 2003). Die Studie zeigte, dass ABCB5<sup>+</sup> humane epidermale Melanozyten das Membranpotential regulieren.

Durch Zellfusion entstehen aus diesen polyploide ABCB5<sup>+</sup> Zellen (Frank *et al.* 2003). Man nimmt an, dass es durch Zellfusion zur zellulären Re-Programmierung und De-Differenzierung kommt und ABCB5<sup>+</sup> Progenitorzellen aus der Haut sich somit positiv auf das Gewebewachstum und die Gewebedifferenzierung auswirken (Frank *et al.* 2003). ABCB5<sup>+</sup> Zellen könnten daher für die einzigartige Erneuerungsfähigkeit der humanen Haut mit verantwortlich sein (Frank *et al.* 2003).

Weitere Studien konnten zeigen, dass ABCB5<sup>+</sup> Zellen auch im *Stratum reticulare* (vgl. Abbildung 3) der Dermis mit einem Anteil von bis zu 4 % der gesamten Hautzellen vorkommen (Schatton *et al.* 2015). Vor allem in gesunden Probanden jeder Altersgruppe wurden ABCB5<sup>+</sup> Hautzellen gefunden (Kim *et al.* 2010). Sie teilen einige Merkmale von mesenchymalen Stammzellen, wie die Plastikadhärenz, die adipogene und osteogene Differenzierungsfähigkeit sowie die Expression einiger Stammzellmarker, u.a. CD29, CD44, CD59 und CD90. Die hämatopoetischen Stammzellmarker CD31 und CD45 wurden jedoch nicht exprimiert (Dominici *et al.* 2006; Kim *et al.* 2010; Meier *et al.* 2010; Schatton *et al.* 2015).

ABCB5 wird auch auf Tumorzellen mit CD133 koexprimiert (Wilson *et al.* 2011). Es wird jedoch nicht nur in Melanozyten und malignen Melanomen exprimiert, sondern allgemein in pigmentproduzierenden Zellen, wie den RPE (*retinal pigment epithelial cells*) des Auges (Chen *et al.* 2005). So wird ABCB5 in amelanotischen Melanomen, d.h. in Melanomen ohne Pigmente nicht exprimiert. Dadurch könnte die Expression von spezifischen Isoformen von ABCB5 als molekularer Marker für die Differentialdiagnostik genutzt werden (Chen *et al.* 2005; Chen *et al.* 2009). Auch auf limbalen Stammzellen (LSC) der Hornhaut des Auges wurden ABCB5<sup>+</sup> Zellen gefunden. Sie dienen als Marker für die LSC und sind verantwortlich für die Homöostase, Aufrechterhaltung, Entwicklung und Reparatur der Hornhaut (Ksander *et al.* 2014). Ein Defizit von LSC ist einer der Hauptgründe für Blindheit. Ksander *et al.* fanden heraus, dass ein ABCB5 *knockout* in Mäusen, aufgrund einer verstärkten Proliferation und Apoptose, zum Abbau von limbalen Stammzellen mit konsekutiver fehlerhafter Hornhautdifferenzierung und Wundheilung führte. Eine Transplantation von humanen oder murinen ABCB5<sup>+</sup> limbalen Stammzellen in LSC-defizienten Mäusen belegte die einzigartige Fähigkeit zur vollständigen Regeneration der Hornhaut (Ksander *et al.* 2014). Diese Ergebnisse deuten auf ein großes regeneratives Potential der ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen hin, nicht nur für Haut und Hornhaut (Frank & Frank 2015). Sie könnten auch zur Behandlung anderer Erkrankungen, die ein hohes regeneratives Potential erfordern, wie z.B. akute und chronische Lebererkrankungen, von großem therapeutischem Interesse sein.

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Der Mangel an Spenderlebern forciert die Suche nach brauchbaren Alternativen zur Behandlung von akuten und chronischen Lebererkrankungen. Neben der Transplantation von Hepatozyten selbst, die ebenfalls von Organspenden abhängig ist, sind aus Stammzellen abgeleitete Hepatozyten, insbesondere aus mesenchymalen Stammzellen, derzeit Hoffnungsträger in der regenerativen Medizin für die Therapie bei Lebererkrankungen. Mesenchymale Stammzellen können *in vitro* unter der Verwendung spezifischer Wachstumsfaktoren, wie z.B. *epidermal growth factor* (EGF) und *hepatocyte growth factor* (HGF), zu Hepatozyten ähnlichen Zellen differenzieren und leberspezifische Eigenschaften entwickeln. Als Zellersatz können sie in die Leber transplantiert werden. Dort integrieren sie sich ins Leberparenchym, proliferieren und entwickeln funktionelle Merkmale von Hepatozyten. Im Tiermodell unterstützen sie die Leberregeneration bei unterschiedlichen akuten und chronischen Lebererkrankungen (Aurich *et al.* 2007).

In der vorliegenden Arbeit sollte die Wirkung von undifferenzierten und hepatogen differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen aus der menschlichen Haut hinsichtlich der Unbedenklichkeit der hepatischen Applikation für die mögliche künftige Therapie bei akuten oder chronischen Lebererkrankungen untersucht werden. Diese Zellen haben den Vorteil, dass sie leicht verfügbar und ethisch wenig bedenklich sind. Weiterhin bieten sie die Möglichkeit einer Eigenspende.

Es sollten adulte mesenchymale Stammzellen aus der menschlichen Haut einer Mischpopulation (Parentalstammzellen) und die daraus selektionierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen untersucht werden, die von der Firma RHEACELL GmbH & Co. KG zur Verfügung gestellt wurden. Es war das Ziel, die Differenzierungsfähigkeit dieser Zellpopulationen in hepatozytäre Zellen zu untersuchen. In der immundefizienten Maus sollte weiterhin die Wirkung der Zellen auf die Leberfunktion nach hepatischer Applikation untersucht werden.

### 3 Material und Methoden

Die adulten Stammzellen der menschlichen Haut, zum einen eine Mischpopulation von mesenchymalen Stammzellen (Parentalstammzellen) und zum anderen die daraus selektionierte ABCB5<sup>+</sup> Subpopulation, wurden von der Firma RHEACELL GmbH & Co. KG isoliert und zur Verfügung gestellt

#### 3.1 Zellkulturarbeiten

##### 3.1.1 Kultivierung von Stammzellen

Die zur Verfügung gestellten kryokonservierten Stammzellen wurden im Wasserbad zügig bei 37°C aufgetaut und in 9 ml Kulturmedium DMEM-*high glucose* (4,5 g/l Glucose (Gibco®, Life Technologies GmbH, Darmstadt)) aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension zentrifugiert (270 g, 5 min, 5°C (Heraeus™ Megafuge™ 16R, Thermo Scientific, Dreieich)) und zweimal mit DMEM-*high glucose* gewaschen. Das Zellpellet wurde in 2 ml Erhaltungsmedium EM6F resuspendiert (Tabelle 2).

Tabelle 2: Zusammensetzung des Erhaltungsmediums EM6F.

Name	Konzentration	Hersteller
Selen	5 ng/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Transferrin	5 µg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Linolsäure	4,7 µg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dexamethason	1 nM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Insulin	5 µg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ascorbinsäure	0,1 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Penicillin/Streptomycin	1 %	c.c. pro, Oberdorla
FKSi	15 %	Gibco®, Life Technologies GmbH, Darmstadt
→ gelöst in 60 % DMEM 1 g Glucose/l		Biochrom GmbH, Berlin
40 % MCDB 201		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*; FKS<sub>i</sub>, inaktiviertes fetales Kälberserum

Zur Bestimmung der Zellzahl pro ml wurden 20 µl der Zellsuspension mit 60 µl PBS (*phosphate-buffered saline*) (Invitrogen™, Thermo Scientific, Dreieich) und 80 µl Trypanblau (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) versetzt und mittels Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (Hecht Assistent, Sondheim/Röhn) ausgezählt. Die Zellzahl/ml wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{ausgezählte Zellzahl}}{\text{Zahl der ausgezählten Großquadrate}} \times \text{Kammervolumen mm}^3 \times \text{Verdünnung}$$

Die Zellen wurden anschließend mit einer Zelldichte von ca. 400 Zellen/cm<sup>2</sup> auf zuvor mit humanem Fibronectin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) beschichteten Zellkulturschalen ausgesät.

### 3.1.2 Multiple Differenzierung der Stammzellen

Die multiple Differenzierungsfähigkeit ist ein wichtiges Kriterium zur Definition mesenchymaler Stammzellen. Zur Überprüfung wurde repräsentativ jeweils eine Präparation der Parentalstammzellen und eine Präparation der ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen bis zu einer Konfluenz von 90 % im Erhaltungsmedium EM6F kultiviert. Im Anschluss erfolgte zur Demethylierung der DNA die Behandlung mit 5 mM 5'-Azacytidin (Verdünnung 1:150, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) für 24 h. Die weitere Kultivierung erfolgte in den spezifischen Differenzierungsmedien, welche in Tabelle 3 aufgeführt sind. Eine Analyse der multiplen Differenzierungsfähigkeit erfolgte zu den Zeitpunkten 0 Tage, 7 Tage differenziert, 14 Tage differenziert und 21 Tage differenziert. Eine Übersicht der Kultivierung bietet die Zeitachse in Abbildung 4.

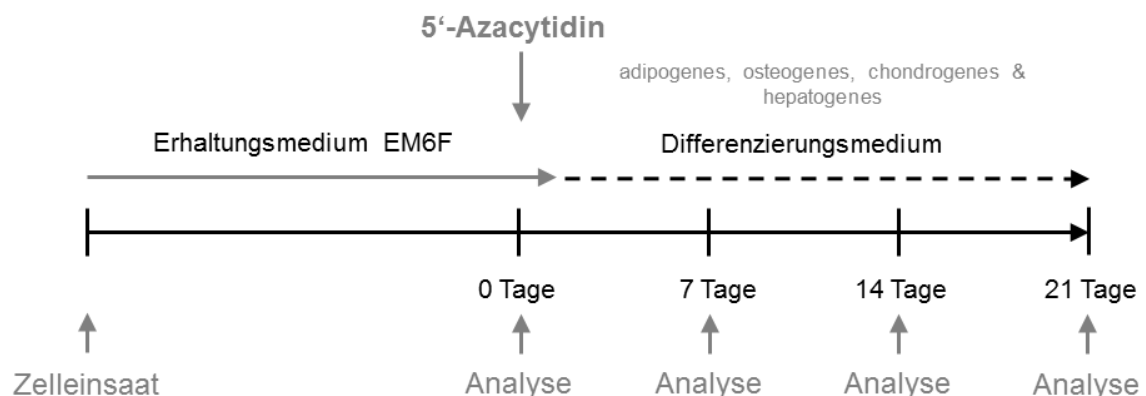


Abbildung 4: Zeitachse der Kultivierung im Erhaltungsmedium EM6F und im spezifischen Differenzierungsmedium von adulten Parentalstammzellen und ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen der menschlichen Haut.  
EM6F, Erhaltungsmedium

Tabelle 3: Zusammensetzung der Differenzierungsmedien.

Name	Konzentration	Hersteller
<b>adipogenes Differenzierungsmedium</b>		
Dexamethason	50 µM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
bovines Insulin	10 µg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Indomethacin	100 µM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
IBMX	500 µM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Rosiglitazon	5 mM	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach
Penicillin/Streptomycin	1 %	c.c. pro, Oberdorla
FKSi	2,5 %	Gibco®, Life Technologies GmbH, Darmstadt
→ gelöst in DMEM 1 g Glucose/l		Biochrom GmbH, Berlin
<b>chondrogenes Differenzierungsmedium</b>		
pTGF-β1	10 ng/ml	BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln
Dexamethason	100 nM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Thyroxin	50 ng/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
ITS + 1	1:100	s. Tabelle 4
Penicillin/Streptomycin	1 %	c.c. pro, Oberdorla
FKSi	2,5 %	Gibco®, Life Technologies GmbH, Darmstadt
→ gelöst in MEM		Biochrom GmbH, Berlin
<b>osteogenes Differenzierungsmedium</b>		
Ascorbinsäure	200 µM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dexamethason	1 µM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Glycerol 2-phosphate	10 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Penicillin/Streptomycin	1 %	c.c. pro, Oberdorla
FKSi	2,5 %	Gibco®, Life Technologies GmbH, Darmstadt
→ gelöst in DMEM 1 g Glucose/l		Biochrom GmbH, Berlin
DMEM, <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> ; FKSi, inaktiviertes fetales Kälberserum; IBMX, 3-Isobutyl-1-methylxanthin; ITS, Insulin-Transferrin-Selenit; MEM, <i>minimal essential medium</i> ; pTGF-β1 <i>platelet-derived transforming growth factor β1</i>		

Tabelle 4: Zusammensetzung ITS+1

Name	Konzentration	Hersteller
Insulin	1 mg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Transferrin	0,55 mg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natrium Selenite	0,5 µg	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
bovines Serumalbumin	50 mg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Linolsäure	470 mg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
→ gelöst in PBS		Invitrogen™, Thermo Scientific, Dreieich

PBS, *phosphate-buffered saline*

Für die hepatogene Differenzierung wurde nach einem in der Arbeitsgruppe „Angewandte Molekulare Hepatologie“ entwickelten Protokoll für mesenchymale Stammzellen gearbeitet (Stock *et al.* 2010). Die Kultivierung erfolgte ebenfalls bis zu einer Konfluenz von 90 %. Die Zellen wurden anschließend mit 5 mM 5'-Azacytidin (Verdünnung 1:150, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) für 24 h inkubiert. Die weitere Kultivierung erfolgte im humanen Wachstumsmedium HHMM. HHMM besteht zu 50 % aus HGM und 50 % aus MEM mit den entsprechenden Zusätzen (Tabelle 5). Vor Gebrauch wurde das Wachstumsmedium mit 2,5 % FKS<sub>i</sub> (Gibco®, Life Technologies GmbH, Darmstadt), 1 % Penicillin/Streptomycin (c.c. pro, Oberdorla) und den Wachstumsfaktoren EGF (20 µg/l; PeproTech, Hamburg) und HGF (40 µg/l; Strathmann Biotec AG, Hamburg) versetzt. Eine Übersicht der Kultivierung bietet die Zeitachse in Abbildung 4.

Die Zellmorphologie der undifferenzierten Parentalstammzellen und der ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen wurde zum Zeitpunkt 0 und während der hepatogenen Differenzierung zu den Zeitpunkten 7 Tage, 14 Tage und 21 Tage mikroskopisch (Primo Vert, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena) analysiert und dokumentiert (ZEN lite 2012, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena). Für molekularbiologische Analysen wurden zusätzlich die RNA sowie das Gesamtprotein der Zellen gewonnen.



Tabelle 5: Zusammensetzung des Wachstumsmediums HHMM.

Name	Konzentration	Hersteller
<b>Hepatocyte growth medium - HGM</b>		
Albumin	0,2%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Galaktose	11,1 mM	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ornithin	0,6 mM	Merck Millipore GmbH, Schwalbach
Prolin	0,26 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Hepes	9,98 mM	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Nicotinamid	2,5 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Glutamin	0,99 mM	Merck Millipore GmbH, Schwalbach
ZnCl <sub>2</sub>	54,4 µg/l	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	20 µg/l	Merck Millipore GmbH, Schwalbach
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	75 µg/l	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
MnSO <sub>4</sub>	25 µg/l	Merck Millipore GmbH, Schwalbach
Penicillin/Streptomycin	1 %	c.c. pro, Oberdorla
Dexamethason	0,1 µM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
ITS	0,005 %	Roche, Mannheim
→ gelöst in 500ml DMEM (4,5 g Glucose/l)		Gibco®, Life Technologies GmbH, Darmstadt
und 500 ml DMEM w/o Glucose		Gibco®, Life Technologies GmbH, Darmstadt

**Minimum Essential Medium With Earle's salts - MEM**

Insulin	500 ng/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Gentamycin	50 µg/ml	Biochrom GmbH, Berlin
→ gelöst in MEM		Biochrom GmbH, Berlin

DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*; ITS, Insulin-Transferrin-Selenit; MEM, *Minimum essential medium*

**3.1.3 Nachweis der adipogenen Differenzierung**

Die adipogene Differenzierung wurde durch die Einlagerung von Lipidtröpfchen in die Zelle mittels Sudan III-Lösung (1 g 100/ml Sudan III (Carl Roth GmbH + Co. KG) in 70 % Ethanol) nachgewiesen. Der Farbstoff Sudan III, ein Azofarbstoff, diffundiert aus seinem Lösungsmittel (70 %iger Ethanol), in das Substrat (Fett), in dem er sich besser löst (Junqueira & Carneiro 1996; Mulisch & Welsch 2015).

Die Zellen wurden auf der Zellkulturschale mit PBS gespült, für 20 min mit filtrierter Sudan III-Lösung inkubiert und anschließend erneut mit PBS gewaschen. Die mikroskopische Dokumentation der gefärbten Lipidtröpfchen erfolgte in den Parentalstammzellen und den ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen zu den Zeitpunkten 0 Tage (undifferenziert), 7 Tage differenziert, 14 Tage differenziert und 21 Tage differenziert (Primo Vert, ZEN lite 2012 Software, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena).

### 3.1.4 Nachweis der osteogenen Differenzierung

Zum Nachweis der osteogenen Differenzierung erfolgte die Detektion des Enzyms alkalische Phosphatase mittels BCIP-Lösung (BCIP®/NBT Liquid Substrate System, Sigma-Aldrich Chemie GmbH). Die BCIP-Lösung besteht aus BCIP (5-Bromo-4-chlor-3-indoxylphosphat) und NBT (*nitroblue tetrazolium*). Das BCIP bildet das Substrat für die alkalische Phosphatase, welche Indolylphosphat zu 5-Brom-4-chlorindolyl und Phosphat hydrolysiert. Durch Oxidation von 5-Brom-4-chlorindolyl und Dimerisierung entsteht 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo, ein tiefblauer Farbstoff (Abbildung 5:).

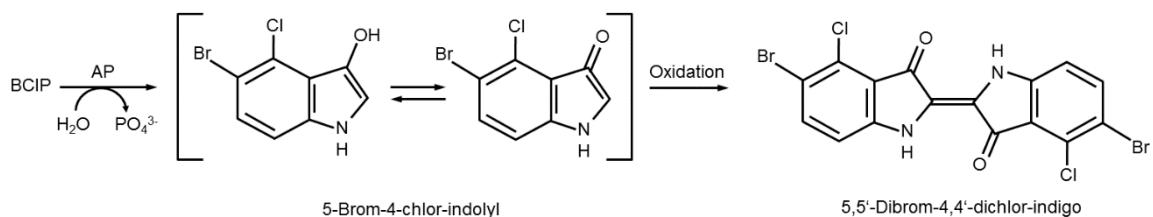


Abbildung 5: Nachweisreaktion des Enzyms alkalische Phosphatase.

AP, alkalische Phosphatase (Abbildung modifiziert nach Datenblatt 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate disodium salt (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München)

Die Zellen wurden auf der Zellkulturschale mit PBS gespült, mit einem 1:1 Methanol/Aceton-Gemisch bei -20°C für 5 min fixiert, zweimal mit kaltem *Aqua dest.* gespült und anschließend für 10 min mit BCIP-Lösung inkubiert. Nach erneutem spülen mit *Aqua dest.* erfolgte die mikroskopische Dokumentation der Parentalstammzellen und den ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen zu den Zeitpunkten 0 Tage (undifferenziert), Tage differenziert, 14 Tage differenziert und 21 Tage differenziert (Primo Vert, ZEN lite 2012 Software, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena).

### 3.1.5 Nachweis der chondrogenen Differenzierung

Zum Nachweis der chondrogenen Differenzierung erfolgte die Färbung von Knorpel mittels *Alcian Blue*-Lösung (1 % Alcian Blue (Alcian Blue 8GX Solution, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) in 3 %iger Essigsäure). Alcian Blue 8GX färbt neutrale und saure, sulfatierte und phosphorylierte Mucopolysaccharide, wie sie in Knorpelgewebe vorkommen, blau.

Die Zellen wurden auf der Zellkulturschale mit PBS gespült um das Medium vollständig zu entfernen, dann 3 min mit 3 %iger Essigsäure fixiert, mit *Aqua dest.* gespült und anschließend für 30 min mit Alcian Blue-Lösung inkubiert. Nach erneutem spülen mit *Aqua dest.* erfolgte die mikroskopische Dokumentation der Parentalstammzellen und den ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen zu den Zeitpunkten 0 Tage (undifferenziert), 7 Tage differenziert, 14 Tage differenziert und 21 Tage differenziert (Primo Vert, ZEN lite 2012 Software, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena).

### 3.1.6 Nachweis der hepatogenen Differenzierung mittels PAS-Reaktion

Die Einlagerung von Glykogen diente zum Nachweis der hepatogenen Differenzierung und wurde mittels der PAS-Reaktion (*periodic acid Schiff-reaction*) durchgeführt. Die Periodsäure katalysiert die Oxidierung von 1,2-Diolen. Dabei entstehende Dialdehyde reagieren mit der fuchsin-schweifigen Säure des Schiff-Reagenz zu einem magentaroten Farbstoff (Abbildung 6, Junqueira & Carneiro 1996).

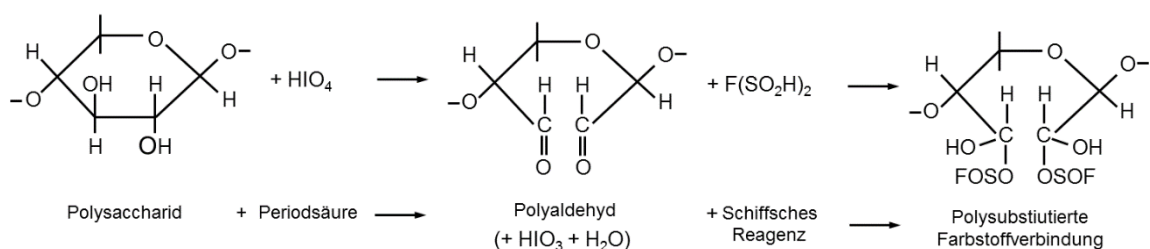


Abbildung 6: Periodsäure-Schiff-(PAS-)Reaktion.

Die Periodsäure oxidiert die 1,2-Diole zu Dialdehyden, die mit dem Schiff'schen Reagenz ein magentaroter Farbstoff bilden (Abbildung modifiziert nach Junqueira & Carneiro 1996).

Die Zellen wurden auf der Zellkulturschale mit *Aqua dest.* gespült. Anschließend wurden die Zellen mit einem 1:1 Methanol/Aceton-Gemisch bei -20°C für 5 min fixiert, zweimal mit *Aqua dest.* gespült und mit 1 % Periodsäure (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) für 10 min inkubiert. Nach zweimaligem spülen mit *Aqua dest.* erfolgte die Inkubation mit

Schiffs-Reagenz (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) für 15 min. Nach erneutem Spülen mit lauwarmem *Aqua dest.* erfolgte die mikroskopische Dokumentation der Glykogeneinlagerung in den Parentalstammzellen und in den ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen zu den Zeitpunkten 0 Tage (undifferenziert), 7 Tage differenziert, 14 Tage differenziert und 21 Tage differenziert (Primo Vert, ZEN lite 2012 Software, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena).

### 3.1.7 Durchflusszytometrie

Ein weiteres Kriterium zur Definition von mesenchymalen Stammzellen ist die Expression spezifischer Oberflächenmarker, auch *cluster of differentiation* (CD-Marker) genannt. Die Durchflusszytometrie wurde zur quantitativen Analyse der Parentalstammzellen und ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen zum Zeitpunkt 0 Tage (undifferenziert) sowie während der hepatogenen Differenzierung zu den Zeitpunkten 7 Tage, 14 Tage und 21 Tage (LSR II, Core Unit Fluoreszenztechnologie, IZKF, Universität Leipzig) durchgeführt. Die verwendeten Antikörper sind Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 6: Übersicht der für die Durchflusszytometrie verwendeten Antikörper.

Antikörper	Typ	Markierung	Hersteller
IgG <sub>1</sub> /IgG <sub>1</sub>	mouse anti-human		BD Simultest™
CD13	mouse anti-human	PE	BD FACS™
CD14	mouse anti-human	FITC	BD FACS™
CD29	mouse anti-human	PE	BD Pharmingen™
CD34	mouse anti-human	PE	BD Pharmingen™
CD44	mouse anti-human	PE	BD Pharmingen™
CD45	mouse anti-human	FITC	BD FACS™
CD54	mouse anti-human	PE	BD FACS™
CD71	mouse anti-human	PE	BD Pharmingen™
CD90	mouse anti-human	FITC	BD Pharmingen™
CD105	mouse anti-human	PE	BD Pharmingen™
CD166	mouse anti-human	PE	BD Pharmingen™

BD Biosciences, Heidelberg; FITC, Fluoroisothiocyanate; PE, Phycoerythrin

Für die Analyse mittels Durchflusszytometrie wurden die Stammzellen über die oben genannten Zeiträume kultiviert. Zum Analysezeitpunkt wurden sie dreimal mit PBS gewaschen und mit 0,5 % Trypsin:EDTA-Lösung (c-c-pro, Oberdorla) für 5 min bei 37°C von der Zellkulturplatte gelöst. Die Proteasereaktion wurde mit der Zugabe von eiskaltem PBS im Verhältnis 2:1 zur Trypsin:EDTA-Lösung gestoppt. Die Zellsuspension wurde dreimal mit PBS gewaschen und zentrifugiert (270 g, 5 min, 5°C (Heraeus™ Megafuge™ 16R, Thermo Scientific, Dreieich)). Das Zellpellet wurde anschließend in Abhängigkeit der Pelletgröße mit 10-20 ml PBS resuspendiert und filtriert (100 µm EASYstrainer™, greiner bio-one, Frickenhausen). Nach der Bestimmung der Gesamtzellzahl (vgl. 3.1.1.) wurden jeweils 200.000 Zellen in Röhrchen (Falcon™, BD Biosciences, Heidelberg) für die FACS-Analyse mit 500 µl Pufferlösung (1 % inaktiviertes FKS in PBS, FKSi-PBS) überführt und zentrifugiert (270 g, 5 min, 5°C (Heraeus™ Megafuge™ 16R, Thermo Scientific, Dreieich)). Anschließend wurden die Proben mit 5 µl des Antikörpers (Tabelle 6) bzw. einer Isotypenkontrolle (Simultest™ Control, BD Biosciences, Heidelberg) für 30 min bei Raumtemperatur schwenkend und dunkel inkubiert. Nach der Inkubation folgten drei Waschschrte mit FKSi-PBS und die anschließende Aufnahme in 150 µl FKSi-PBS. Vor der Messung der Proben wurden 5 µl Propidiumiodid (1 mg/ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München), zur Lebend/Tot-Diskriminierung der Zellen, hinzugefügt. Die Analyse der Oberflächenmarker erfolgte am LSR II, Core Unit Fluoreszenztechnologie mit der Software BD FACSDiva 8.0.1 am Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung der Universität Leipzig. Wichtige Parameter bei der Auswertung waren die relative Größe der Zellen (FSC, *forward scatter*) sowie die Granularität (SSC, *side scatter*). Anhand dieser Parameter konnten Trümmer und Dubletten von den Einzelzellen unterschieden werden. Die Zellen wurden durch die entsprechende Markierung der Antikörper (Tabelle 6) mit den Farbstoffen Fluorescein (FITC) und Phycoerythrin (PE) angeregt und emittierten grünes oder oranges Licht. Die Isotypenkontrolle diente als Negativkontrolle um mögliche unspezifische Bindungen der Zellen aufzuzeigen. Gemessen wurden 10.000 vitale Zellen je Probe.

### 3.1.8 Messung der Harnstoffsyntheserate

Ein funktionelles Merkmal von Hepatozyten ist die Harnstoffsynthese. Sie findet in periportal lokalisierten Hepatozyten in der Leber statt und dient dazu, den aus dem Abbau von Aminosäuren und mit dem Portalblut aus dem Darm in die Leber flutenden Ammoniak zu Harnstoff umzuwandeln, um diesen letztendlich über die Niere auszuscheiden (Jungermann 1995; Lüllmann-Rauch & Asan 2015).

Zur Analyse wurde die Nachweisreaktion von Yuki *et al.* verwendet. Diacetylmonoxim und Thiosemicarbazid reagieren zu einem Diacetylmonoxim-thiosemicarbazon. Das Semicarbazon reagiert nun mit Harnstoff zu einem kationischen, rot gefärbten Farbstoff, der photometrisch bestimmt werden kann. Die Konzentration des Harnstoffs ist dabei direkt proportional zur Intensität des Farbstoff (Yuki *et al.* 1981).

Zur Bestimmung der Harnstoffsyntheserate wurden die Zellen im 12-Well-Format kultiviert. Der Mediumüberstand von undifferenzierten Parentalstammzellen und ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen sowie hepatogen differenzierten Stammzellen wurde zu den Zeitpunkten 7, 14 und 21 Tage analysiert. Dazu fand 24 h vor der Messung ein Medienwechsel statt. Je 40 µl des Mediumüberstandes wurden mit 1,25 ml Reaktionslösung, das zu gleichen Teilen aus *mixed acid reagent* (Tabelle 7), *mixed colour reagent* (Tabelle 8) und *Aqua dest.* besteht, versetzt und für 10 min bei 95°C im Thermomixer (Eppendorf AG, Hamburg) schüttelnd inkubiert. Die Proben wurden anschließend für 10 min auf Eis gelagert um die Reaktion zu stoppen. Die Messung erfolgte im GloMax®-Multi Detection System (Promega GmbH, Mannheim) bei einer Wellenlänge von 560 nm. Zur Berechnung der Harnstoffsyntheserate wurde eine für jeden Ansatz frisch hergestellte Harnstoffstandardreihe (0-12,5 µg/ml Harnstoff) mitgeführt. Diese wurde aus Harnstoff (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) und dem entsprechend verwendeten Kulturmedium hergestellt. Für die undifferenzierten Stammzellen wurde EM6F und für die hepatogen differenzierten Stammzellen HHMM verwendet. Die Medien wurden ebenfalls für 24 h im Brutschrank inkubiert. Zur Auswertung der Daten wurde die Software Microcal™ Origin™ 5.0 (Origin-Lab Corporation, Northampton) verwendet.

Tabelle 7: Zusammensetzung des *mixed acid reagent*.

Name	Menge	Hersteller
<b><i>mixed acid reagent</i></b>		
Schwefelsäure	100 ml	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
<i>Aqua dest.</i>	400 ml	
<i>stock acid reagent</i>	300 µl	
<b><i>stock acid reagent</i></b>		
Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat	1 g	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Phosphorsäure	20 ml	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
<i>Aqua dest.</i>	30 ml	

Tabelle 8: Zusammensetzung des *mixed colour reagent*.

Name	Menge	Hersteller
<b><i>mixed colour reagent</i></b>		
<i>stock colour reagent A</i>	35 ml	
<i>stock colour reagent B</i>	35 ml	
<i>Aqua dest.</i>	430 ml	
<b><i>stock colour reagent A</i></b>		
Diacetylmonoxim-2,3-butanedioneoxime	2 g	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
<i>Aqua dest.</i>	100 ml	
<b><i>stock colour reagent B</i></b>		
Thiosemicarbatid	0,5 g	Merck Millipore GmbH, Schwalbach
<i>Aqua dest.</i>	100 ml	

Als Positivkontrolle dienten 8 Tage kultivierte primäre Maushepatozyten. Die Harnstoffsyntheserate wurde auf 10.000 Zellen je 24 h Kulturzeit bezogen und nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Absorption}_{560 \text{ nm}} \text{ Probe}}{\text{Anstieg der Eichgeraden}} = \text{Harnstoff } \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$$

$$\frac{\text{Harnstoff } \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}}{\text{Gesamtzellzahl}} \times 10.000 \text{ Zellen} = \frac{\text{Harnstoff } \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}}{10.000 \text{ Zellen}}$$

$$\frac{\text{Harnstoff } \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times 10.000 \text{ Zellen}^{-1}}{\text{Molare Masse Harnstoff } \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = \frac{\text{Harnstoff mol}}{10.000 \text{ Zellen} \times 24 \text{ h}}$$

### 3.1.9 Bestimmung der Enzymaktivität von CYP1A1 und CYP2B1

Ein weiteres wichtiges funktionelles Merkmal von Hepatozyten ist die Fähigkeit zum Fremdstoffmetabolismus und somit die Metabolisierung von Endo- und Xenobiotika. Die Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen mit ihrem breiten Substratspektrum sind dabei die wichtigsten Enzyme der Phase I des Fremdstoffmetabolismus und somit wesentlicher Bestandteil des Detoxifizierungsprozesses in der Leber (Guengerich 2001).

Zur Messung der Aktivität von Enzymen des Fremdstoffmetabolismus wurde in undifferenzierten sowie hepatogen differenzierten Parentalstammzellen und ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen die Enzymaktivität von Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1) und Cytochrom P450 2B1 (CYP2B1) bestimmt.

Das spezifische Nachweissubstrat für CYP1A1 ist 7-Ethoxyresorufin und für CYP2B1 7-Pentoxyresorufin, weshalb beide auch als EROD (Ethoxyresorufin-O-deethylase) und PROD (Pentoxyresorufin-O-dealkylase) bezeichnet werden. Die Substrate 7-Ethoxyresorufin und 7-Pentoxyresorufin werden jeweils zu fluoreszierendem Resorufin umgesetzt (Abbildung 7). Die dabei auftretende Fluoreszenz dient als Maß für die Enzymaktivität und kann mit einem Fluoreszenzphotometer gemessen werden.

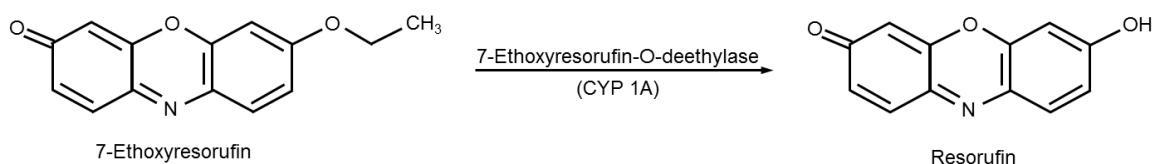


Abbildung 7: Nachweisreaktion der Enzymaktivität von Cytochrom P450 1A. 7-Ethoxyresorufin wird von Cytochrom P450 1A (CYP1A1) durch oxidative Dealkylierung zum fluoreszierenden Resorufin umgesetzt (Abbildung modifiziert nach Burke und Mayer 1974).

Für die Bestimmung der Enzymaktivität wurden die Zellen im 12-Well-Format kultiviert. Ein Well wurde jeweils mit 10 µM Dicumarol-Lösung und EROD-Lösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) oder PROD-Lösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) im Verhältnis 1:1000 versetzt und für 2 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Als Negativkontrolle wurde das Zellkulturmedium HHMM verwendet, welches zuvor 24 h im Brutschrank inkubiert. Von jeder Probe wurden anschließend 75 µl Mediumüberstand entnommen mit 25 µl Enzymgemisch (0,1 M Natriumacetat, pH = 4,5; 1:100 β-Glucoronidase/Arylsulfatase (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)) versetzt und erneut für 2 h schwenkend bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 200 µl 96 %igem Ethanol abgestoppt. Die Proben wurden gut gemischt und zentrifugiert (1538 g, 5 min, 4°C (Heraeus™ Fresco™ 21, Thermo Scientific)). Die Messung der Fluoreszenz erfolgte im GloMax®-Multi *Detection System* (Promega GmbH, Mannheim) in Vierfachbestimmung bei einer Anregungswellenlänge von 525 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm. Zur Berechnung der Resorufinkonzentration wurde eine für jeden Ansatz frisch hergestellte Standardreihe (0-1 µM Resorufin) mitgeführt und das dafür verwendete Medium HHMM ebenfalls zuvor für 24 h im Brutschrank inkubiert. Zur Auswertung der Daten wurde die Software Microcal™ Origin™ 5.0 (OriginLab Corporation, Northampton) verwendet.



Als Positivkontrolle dienten auch hier 8 Tage kultivierte primäre Maushepatozyten. Die Enzymaktivität wurde auf 10.000 Zellen je Stunde Kulturzeit bezogen und nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Absorption}_{525 \text{ nm Probe}}}{\text{Anstieg der Eichgeraden}} = \text{Resorufin } \frac{\mu\text{mol}}{\text{l}}$$

$$\frac{\text{Resorufin } \frac{\mu\text{mol}}{\text{l}}}{\text{Gesamtzellzahl}} \times 10.000 \text{ Zellen} = \frac{\text{Resorufin } \frac{\mu\text{mol}}{\text{l}}}{10.000 \text{ Zellen}}$$

$$\frac{\text{Resorufin } \frac{\mu\text{mol}}{\text{l}} \times 10.000 \text{ Zellen}^{-1}}{\text{Inkubation h} \times \text{Volumen l}} = \frac{\text{Resorufin } \mu\text{mol}}{10.000 \text{ Zellen} \times \text{h}}$$

### 3.1.10 Analyse des Sekretoms undifferenzierter und hepatogen differenzierter ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen sind in der Lage Proteine, z.B. Zytokine und Chemokine, zu sezernieren. Diese Faktoren können parakrine Effekte auf andere Zellen des Organismus haben und sich beispielsweise nach Transplantation bei Leberteilresektion auf Proliferation und Differenzierung der Leber auswirken (Christ *et al.* 2015). Die Sekretomanalyse wurde mittels des humanspezifischen Proteome Profiler™ Cytokine Array Kits (ARY022, R&D System, Wiesbaden-Nordenstadt) durchgeführt. Mit diesem Array können 102 verschiedene Proteine, die mit auf den Membranen fixierten Antikörpern erkannt werden, gleichzeitig erfasst (Anlage 1). Analysiert wurden Mediumüberstände von je vier Präparationen undifferenzierter und 14 Tage hepatogen differenzierter ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen. Das jeweilige Medium ohne Stammzellen diente als Negativkontrolle.

Für die Sekretomanalyse wurden ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen in 25 cm<sup>2</sup> Flaschen von RHEACELL GmbH & Co. KG zur Verfügung gestellt. Die hepatogene Differenzierung erfolgte analog zu 3.1.2. Ein Medienwechsel erfolgte 24 h vor der Messung und wurde ohne Serumzusatz durchgeführt. Um die Vergleichbarkeit der Präparationen zu gewährleisten, wurde jeweils die Zellzahl (vgl. 3.1.1) bestimmt. Die zu verwendenden Membranen wurden zunächst mit 2 ml Array Buffer 6 für 1 h bei Raumtemperatur schwenkend inkubiert.

Je 300 µl Mediumüberstand wurde mit dem Array Buffer 6 1:5 verdünnt, auf die Membran gegeben und bei 4°C schüttelnd über Nacht inkubiert. Die Membran wurde an-

schließlich 3x 10 min mit dem 1x *Wash Buffer* gewaschen, mit 1,5 ml biotinyliertem *Antibody Cocktail* (30 µl *Detection Antibody Cocktail*; 1,47 ml 1x *Array Buffer 4/6*) für 1 h schwenkend bei Raumtemperatur inkubiert und erneut gewaschen. Nach der Inkubation mit 2 ml 1x Streptavidin-HRP für 30 min wurde die Membran erneut 3x 10 min gewaschen, danach mit 1 ml *Chemi Reagent Mix* (500 µl *Chemi Reagent 1*, 500 µl *Chemi Reagent 2*) versetzt und für 1 min inkubiert. Die Entwicklung erfolgte mittels des Chemilumineszenz-Systems MicroChemi 4.2 (DNR Bio-Imaging Systems, Biostep, Burkhardtsdorf) und der Software Gel Capture (7.0.18, DNR Bio-Imaging Systems, Biostep, Burkhardtsdorf), bei einer Belichtungszeit von 6 min. Die Lichtintensität der einzelnen Spots wurde mit der Software ImageJ 1.48v (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) und dem *AddOn Protein Array Analyzer* ausgewertet. Bei der Auswertung wurde die Mediumkontrolle, die Negativkontrolle sowie die Intensität der Referenzspots berücksichtigt und auf jeweils 750.000 Zellen bezogen. Als untere Detektionsgrenze wurde eine relative Lichtintensität von 5 % gewählt.

$$\text{relative Lichtintensität [\%]} = \frac{\text{rL Messpunkt} - \text{rL Negativkontrolle} - \text{rL Mediumkontrolle}}{\text{Gesamtzellzahl} \times \text{rL Referenzspot}} \times 750.000 \text{ Zellen} \times 100 \%$$

rL, relative Lichtintensität

Mit Hilfe der *STRING* Datenbank (Version 10.0; <http://string-db.org/>, 26.06.2017) konnten Interaktionen zwischen den einzelnen Proteinen und deren mögliche Signalwege analysiert werden.

### **3.1.11 Nachweis undifferenzierter und hepatogen differenzierter ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen *in vitro***

Mittels eines humanspezifischen Antikörpers gegen den Marker Ku80 sollen die transplantierten humanen ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen in der Leber der Empfängermaus nachgewiesen werden. Um die Validität des Nachweises zu prüfen, wurde der Antikörper in den undifferenzierten und differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen *in vitro* nachgewiesen. Ku80 ist eine Untereinheit des Heterodimers Ku und wird ubiquitär in den Zellkernen exprimiert. Es bindet an und stabilisiert die Enden der DNA von Telomeren oder an doppelsträngige DNA-Brüche (Blier *et al.* 1993; Boulton & Jackson 1998).

Zum Nachweis von Ku80 in den Stammzellen wurden die Zellen zunächst auf Deckgläschen kultiviert. Diese wurden mit PBS gewaschen, 15 min mit einem 1:1 Methanol/Aceton-Gemisch bei -20°C fixiert und erneut in PBS gewaschen. Die Zellen wurden 20 min mit 5 %igem Ziegeneserum in PBS und danach 60 min mit 5 %iger BSA-Blockierungslösung (5 % bovines Serumalbumin; 0,5 % Tween; gelöst in PBS) inkubiert. Über Nacht erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper Ku80 (C48E7) (#2180, Cell Signaling, Danvers) mit einer Verdünnung von 1:800 in einer 1 %igen BSA-Lösung (1 % bovines Serumalbumin in PBS). Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen, 60 min mit dem sekundären Antikörper (*goat anti-rabbit IgG*, Alexa Fluor 488 (Invitrogen™, Thermo Scientific, Dreieich)) mit einer 1:200 Verdünnung in 0,5 %iger BSA-Lösung (0,5 % bovines Serumalbumin in PBS) inkubiert, erneut gewaschen und für 5 min mit DAPI (Thermo Scientific, Dreieich) zur Zellkernfärbung inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Deckgläschen mit 50 % Glycerinlösung auf einen Objektträger eingedeckt. Die Zellen wurden am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axio Observer.Z1, Jena) mikroskopiert und dokumentiert.

## **3.2 Molekularbiologische Methoden**

Zur Charakterisierung der Eigenschaften von Parentalstammzellen und ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen vor und nach hepatogener Differenzierung wurde die Expression ausgewählter Gene mittels semi-quantitativer PCR-Analysen bestimmt. Um die Wirkung der Stammzellen nach Transplantation zu beurteilen, wurden ebenfalls Proben aus Mauslebern 2 Tage und 7 Wochen nach der Zelltransplantation untersucht.

### 3.2.1 RNA-Isolierung und Konzentrationsmessung

Zur Isolierung der RNA aus Stammzellen und Lebergewebe (vgl. 3.3.2) wurde das QIAzol *Lysis Reagent* (QIAGEN, Hilden) verwendet. Die Extraktion wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers vorgenommen.

Es wurden 750 µl QIAzol *Lysis Reagent* (QIAGEN, Hilden) auf die Zellkulturschale pipetiert, die Zellen mittels Zellschaber gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Für die Isolierung der RNA aus Lebergewebe, wurden 40 mg Leber, mit 750 µl QIAzol *Lysis Reagent* (QIAGEN, Hilden) versetzt und homogenisiert. Zur Phasentrennung wurde 150 µl Chloroform zugesetzt, durch vortexen gut gemischt und nach 10 min Inkubation auf Eis zentrifugiert (11638 g, 15 min, 4°C (Heraeus™ Fresco™ 21, Thermo Scientific, Dreieich)). Die obere wässrige RNA-haltige Phase wurde anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die RNA-Präzipitation erfolgte durch die Zugabe von 500 µl Isopropanol mit der anschließenden Lagerung der Proben über Nacht bei -20°C. Nach erneutem Zentrifugieren (11638 g, 10 min, 4°C (Heraeus™ Fresco™ 21, Thermo Scientific, Dreieich)) wurde die isopropanolhaltige Phase abgenommen und das Pellet in zwei Waschschritten mit 1 ml 70 %igem Ethanol (RNA aus Zelllysate) bzw. 300 µl 3 M Natriumacetat (RNA aus Lebergewebe) gewaschen und zentrifugiert (9615 g, 5 min, 4°C (Heraeus™ Fresco™ 21, Thermo Scientific, Dreieich)). Das RNA-Pellet (RNA aus Zelllysate) wurde kurz luftgetrocknet. Zum Lösen des Pellets wurden, abhängig von der jeweiligen Pelletgröße, 40-60 µl DEPC-H<sub>2</sub>O (Diethylpyrocarbonat-H<sub>2</sub>O) (Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe) verwendet. Die RNA aus Lebergewebe wurde in 300 µl DEPC-H<sub>2</sub>O (Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe) gelöst, mit 600 µl absolutem Ethanol versetzt und für 1 h bei -80°C gelagert. Nach erneutem Zentrifugieren wurde die RNA zweimal mit 80 %igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde ebenfalls kurz luftgetrocknet und mit 40-60 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst. Alle RNA-Proben wurden bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

Die anschließende Konzentrationsbestimmung der RNA aus Zelllysate erfolgte durch die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm mit DEPC-H<sub>2</sub>O als Blank im Spektralphotometer (Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences, Amersham). Dazu wurde von jeder Probe eine 1:50 Verdünnung hergestellt, diese in eine Quarzmessküvette (Schichtdicke 1 cm) überführt und gemessen.

Da eine Absorption  $A_{260}$  von 1 dabei 40  $\mu\text{g/ml}$  RNA entspricht, lässt sich zur Bestimmung der RNA-Konzentration folgende Formel verwenden:

$$\text{RNA} \left[ \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} \right] = A_{260} \times 40 \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Zur Konzentrationsbestimmung der RNA aus Lebergewebe wurde das NanoVue *Spectrophotometer* (4282 V2.0.3, GE Healthcare, Solingen) verwendet.

Um eine Aussage über die Reinheit der Probe zu treffen, wurde das Verhältnis der Absorption bei 260 nm (Nukleinsäuren) und bei 280 nm (Proteine) ermittelt, dass idealerweise bei 2 liegen sollte. Für alle hier isolierten RNA-Proben wurden Verhältnisse im Bereich von 1,6 bis 2,0 ermittelt, die eine ausreichende Qualität anzeigte.

Um die Intaktheit der RNA aus Zelllysate zu bestätigen, wurde eine Gelelektrophorese in einem 1,5 %igem Agarosegel durchgeführt. Dazu wurden 1,5 g Agarose (peqLab, VWR International GmbH, Dresden) in 82 ml DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und mit 10 ml 10x MOPS (Tabelle 9), 8,3 ml Formaldehydlösung (37 %, Carl Roth GmbH + Co. KG) und 5  $\mu\text{l}$  *GelRed™* (BIOTREND Chemie GmbH, Köln) zugegeben. Für jede Probe wurden 5  $\mu\text{g}$  RNA mit 4  $\mu\text{l}$  2x RNA *Loading Dye Buffer* (Thermo Scientific, Dreieich) versetzt und 10 min bei 70°C inkubiert.

Die Proben wurden 45 min bei 150 V in der Elektrophoresekammer (peqLab, VWR International GmbH, Dresden) in 1x MOPS-Laufpuffer (3-(N-Morpholino)propan-sulfonsäure) aufgetrennt, bestehend aus 10x MOPS mit DEPC-H<sub>2</sub>O verdünnt, und mit dem Gel-Dokumentationssystem von biostep (biostep argus X1, biostep GmbH, Burkhardtshof) dokumentiert.

Tabelle 9: Zusammensetzung der 10x MOPS-Lösung.

Reagenz <sup>1</sup>	Menge
MOPS	41,9 g
Natriumacetat	4,1 g
EDTA	3,7 g
DEPC-H <sub>2</sub> O	1 l

<sup>1</sup>Reagenzien wurden in 1 l DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst; pH = 7,0; autoklavieren  
DEPC-H<sub>2</sub>O, Diethylpyrocarbonat-H<sub>2</sub>O; EDTA, Ethylendiamintetraacetat; MOPS, 3-(N-Morpholino)propan-sulfonsäure

### 3.2.2 cDNA-Synthese

Die zuvor isolierte RNA wurde durch die Verwendung von Oligo-dT-Primern und reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde mit dem Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Dreieich) gearbeitet. Der Syntheseansatz bestand pro Probe aus 2 µg RNA, 1 µl Oligo (dT)<sub>18</sub> Primer, 1 µl dNTP und nuklease-freiem Wasser (auf 15 µl Gesamtvolumen aufgefüllt). Die Proben wurden dann bei 65°C für 5 min im *peqSTAR Thermocycler* (VWR International GmbH, Dresden) inkubiert.

Anschließend wurden die Proben auf Eis gelagert und 4 µl Reaktionspuffer sowie 1 µl reverse Transkriptase (Maxima H minus Enzyme Mix) dazu pipettiert. Es folgte die Inkubation im *peqSTAR Thermocycler* (VWR International GmbH, Dresden) mit anschließender:

- Synthese: 30 min, 50°C
- Denaturierung: 5 min, 85°C

### 3.2.3 Semi-quantitative RT-PCR

Die PCR dient zur Amplifikation zuvor aus mRNA synthetisierter cDNA. Danach wird das entstandene Amplifikat in einem Agarosegel aufgetrennt und mittels Bildanalyse semi-quantitativ bestimmt. Für die PCR wurde je cDNA-Probe 1 µl cDNA verwendet, 10 µl Master-Mix (Thermo Scientific, Braunschweig), 8 µl nuklease-freies Wasser und je 0,5 µl des *forward* und des *reverse* Primers (1:4 Verdünnung aus Primerstock) hinzugefügt. Die verwendeten Primer, die erwartete Größe des PCR-Produktes, die für jeden Ansatz spezifischen *Annealing*-Temperaturen sowie die durchlaufenen Zyklen der cDNA-Synthese sind in Tabelle 10 für die Proben aus Zelllysaten und in Tabelle 11 für die Proben aus Lebergewebe gelistet. Die Primer und ihre Amplifikate wurden mit Hilfe von *NCBI/Primer-BLAST* ausgewählt und überprüft (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Folgende PCR-Bedingungen wurden am *peqSTAR Thermocycler* (VWR International GmbH, Dresden) gewählt:

- Initialisierung: 5 min, 94°C
- Denaturierung: 30 sec, 94°C
- *Annealing*: 45 sec, (Temperatur siehe Tabelle 10 und Tabelle 11)
- Elongation: 45 sec, 72°C
- finale Elongation: 5 min, 72°C

Tabelle 10: Primersequenzen, Größe der PCR-Produkte, *Annealing*-Temperaturen und Anzahl der Zyklen zur Analyse von Genen in kultivierten Stammzellen.

Gen	Primersequenz [5' → 3']	Produktgröße [bp]	T <sub>A</sub> [°C]	Zyklen
<b>Haushaltsgen</b>				
CycA	F: GCTGATGGCGAGCCCTTGGGTC R: ACCAGTGCCATTATGGCGTGTG	189	56	28
<b>Zielgene</b>				
Albumin	F: GATGTCTTCCTGGGCA R: CTTGGGCTTGTGTTTCAC	645	53	38
CK 7	F: TCATCGACAAGGTGCGGTTTC R: CTGCAGCTCTGTCAACTCCGTC	398	62	36
CK 18	F: GAAGGAGACCATGCAAAGCCTG R: CATGAAGAGCAGCTCCTCCTTG	400	62	30
CK 19	F: CGAACCAAGTTTGAGACGGAAC R: CCGCTGGTACTCCTGATTCTGC	600	62	34
CPS I	F: CTGTAAAAGCCATGAAGG R: CAATGGTGTCTGCTGCC	399	53	32
CYP 3A4	F: TCTCATCCCAGACTTGGCCAT R: GGAGACAGAATAACATTCTT	301	55	40
GS	F: CTATGCGGTGACAGAAGCC R: AAAGCAAGATTAAGTGGGCAC	226	58	25
HNF 4	F: ACCCTCGTCGACATGGACATG R: CCTCTTGTCTTTGTCCACCACG	312	63	40
α-SMA	F: CAGGATCTTCATGAGGTAGTC R: TCATCACCAACTGGGACGACA	356	60	20

Die verwendeten Primer stammen von der Firma metabion international AG, München  
bp, Basenpaare; CK, Cytokeratin; CPS I, Carbamoylphosphat-Synthetase I; CycA, Cyclophilin A,  
CYP, Cytochrom P450; F, *forward primer*; GS, Glutamin-Synthetase; HNF4, *hepatocyte nuclear factor 4*; R, *reverse primer*; T<sub>A</sub>, *Annealing* Temperatur [°C]; α-SMA, *α-smooth muscle actin*

Tabelle 11: Primersequenzen, Größe der PCR-Produkte, *Annealing*-Temperaturen und Anzahl der Zyklen zur Analyse von Genen in Mauselebern nach Transplantation von Stammzellen.

Gen	Primersequenz [5' → 3']	Produktgröße [bp]	T <sub>A</sub> [°C]	Zyklen
<b>Haushaltsgene</b>				
B2M	F: TCTACTGGGATCGAGACATGTGA R: ATTGCTATTTCTTTCTGCGTGCAT	124	59	32
TATA	F: TCTGGAATTGTACCGCAGCTT R: ATGACTGCAGCAAATCGCTTG	128	59	32
<b>Zielgene</b>				
Casp3	F: AGCTTGGAACGGTACGCTAA R: GAGTCCACTGACTTGCTCCC	117	59	32
Casp9	F: ACTGCCAAGAAAATGGTCACG R: CAATGGACACGGAGCATCCA	158	59	32
CD36	F: GCTGTTCTAGAAGTTGCTGCC R: TACGTGGCCCGGTTCTACTA	181	60,5	35
FABP1	F: GGAAAAAGTCAAGGCAGTCGTC R: CTCTTGTAGACAATGTGCGCC	138	59	30
IL-6	F: GTGGAAATGAGAAAAGAGTTGTGC R: GGTACTCCAGAAGACCAGAGGA	175	59	35
IL-1β	F: TGCCACCTTTTGACAGTGATG R: TGATGTGCTGCTGCGAGATT	138	59	35
PPARα	F: GTTCACGCATGTGAAGGCTG R: AGCGAATTGCATTGTGTGACAT	172	59	30
SREBP1C	F: GATTTGGCCCGGGGAGATTT R: TGGCGGATGAGGTTCCAAAG	128	59	32
TIMP1	F: CACACCAGAGCAGATACCATGA R: GCTGGTATAAGGTGGTCTCGTT	199	59	32
TNFα	F: GTAGCCCACGTCGTAGCAAA R: ACAAGGTACAACCCATCGGC	137	59	35
VEGF	F: AAGCGCAAGAAATCCCGGTT R: GCTTGTCACATCTGCAAGTACG	178	59	32

Die verwendeten Primer stammen von der Firma metabion international AG, München  
 bp, Basenpaare; B2M, β2-Mikroglobulin; Casp, Caspase; CD36, *cluster of differentiation 36*; F, *forward primer*; FABP1, *fatty acid-binding protein 1*; IL-6, Interleukin-6; IL-1β, Interleukin-1β; PPARα, *peroxisom proliferator-activated receptor α*; R, *reverse primer*; SREBP1C, *sterol regulatory element-binding transcription factor 1C*; T<sub>A</sub>, *Annealing Temperatur* [°C]; TIMP1, *tissue inhibitor of metalloproteinases 1*; TNFα, Tumornekrosefaktor α; VEGF, *vascular endothelial growth factor*



### 3.2.4 Analyse der PCR-Produkte

Zur Analyse der PCR-Produkte wurden diese mittels Gelelektrophorese in einem 2 %igem Agarosegel (2 g Agarose (peqLab, VWR International GmbH, Dresden) in 100 ml 1x TBE-Agarosegel-Laufpuffer (Tabelle 12) aufgetrennt. Je 1 µl der cDNA-Reaktionen wurde mit 4 µl Ladepuffer (Thermo Scientific, Dreiech) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. *GeneRuler 100 bp DNA Ladder* (Thermo Scientific, Dreiech) diente als Marker. Die Proben wurden 35 min bei 150 V in der Elektrophoresekammer (peqLab, VWR International GmbH, Dresden) aufgetrennt, anschließend für 6 min mit 0,5 % Ethidiumbromid (5 mg/ml (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)) in 1x TBE-Laufpuffer gefärbt und mit dem Gel-Dokumentationssystem von biostep (biostep argus X1, biostep GmbH, Burkhardtsdorf) dokumentiert. Für die Analyse der PCR-Produkte aus Lebergewebe wurde das Agarosegel mit dem interkalierenden Farbstoff *GelRed™* markiert. Zur Bestimmung der relativen cDNA Mengen wurde die Intensität der Banden mittels ImageJ 1.48v (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)) bestimmt und die Werte mit dem Haushaltsgen Cyclophilin A für Proben aus Zelllysate und B2M sowie TATA für Proben aus Lebergewebe normalisiert. Als Kontrolle für die Proben aus Zelllysate wurden drei humane Leberproben verwendet.

Tabelle 12: Zusammensetzung der 5x TBE-Lösung.

Reagenz <sup>1</sup>	Menge
Tris	54,45 g
Borsäure	27,5 g
0,5 M EDTA	25 ml
DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 1 l

<sup>1</sup>Reagenzien wurden in DEPC-H<sub>2</sub>O mit einem Endvolumen von 1 l gelöst; pH = 8,0  
DEPC-H<sub>2</sub>O, Diethylpyrocarbonat-H<sub>2</sub>O; EDTA, Ethylendiamintetraacetat; TBE, Tris-Borat-EDTA-Puffer; Tris, Tris(hydroxy-methyl)-aminomethan

### 3.3 Tierexperimentelle Arbeiten

Für die tierexperimentellen Arbeiten wurde ein immundefizientes Mausmodell (*Mus musculus*, C57Bl/6 B6.129S6-*Rag2<sup>tm1Fwa</sup>Prf1<sup>tm1Clrk</sup>* N12) verwendet. Die *Pfp/Rag2<sup>-/-</sup>* Mäuse sind gekennzeichnet durch Mutationen im Perforin-Gen (*Pfp*-Gen) und im *recombination activating gene 2* (*Rag2*-Gen). Diese führen zur verminderten Funktion der Natürlichen Killerzellen sowie zum Verlust von funktionsfähigen reifen T- und B-Lymphozyten. Für die xenogene Transplantation von humanen Stammzellen ist dieses Tiermodell daher besonders gut geeignet, um die Abstoßungsreaktion zu vermeiden.

Die Haltung der Tiere erfolgte unter standardisierten Bedingungen (12 h Tag/Nacht-Rhythmus, klimatisiert) mit freiem Zugang zu Futter und Wasser. Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden von der Landesdirektion Sachsen genehmigt (Tierversuch: 58/15) und unter Einhaltung des Tierschutzgesetzes durchgeführt. Das gesamte Versuchsdesign ist in Tabelle 13 dargestellt. Für alle Experimente wurden männliche Tiere im Alter von 16 Wochen verwendet.

Im Folgenden werden in den *in vivo* Experimenten ausschließlich die Auswirkungen der Injektion von undifferenzierten und 14 Tage hepatogen differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen nach einer 30 %igen Hepatektomie betrachtet. Die Hepatektomie induziert in der Leber einen mitotischen Stimulus, der zu einer verbesserten Integration transplanteder Zellen führen sollte. Um eine hohe Viabilität der Stammzellen zu gewährleisten, wurden die undifferenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen in Spritzen von RHEACELL GmbH & Co. KG zur Verfügung gestellt. Für die Experimente mit hepatogen differenzierten Zellen wurden Kulturfラスchen (Zellkonfluenz 90%) mit undifferenzierten Zellen geliefert und die Differenzierung unmittelbar nach Lieferung gestartet (vgl. Tabelle 13; 3.1.1).

Tabelle 13: Versuchsdesign der Tierexperimente.

Zeitpunkt der Leberentnahme		ABCB5 <sup>+</sup> Stammzellen <sup>1</sup>	Kontrollgruppe
2 Tage	undifferenziert	14 Tage	HRG
		hepatogen differenziert	Trägerkontrolle
7 Wochen	undifferenzierte	14 Tage	HRG
		hepatogen differenziert	Trägerkontrolle

<sup>1</sup>humane adulte Stammzellen der menschlichen Haut (RHEACELL GmbH & Co. KG)  
HRG, 5 %iges humanes Serumalbumin (49,5 Vol.-%), Ringer-Laktat (49,5 Vol.-%); 4 %ige Glucose (1 Vol.-%)

### 3.3.1 Transplantation von undifferenzierten und differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen in immundefiziente Mäuse

Die Narkose wurde mit 5 Vol.-% Isofluran (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim) und einer Sauerstoffflussrate von 1,5 l/min eingeleitet. Das Versuchstier wurde gewogen, rasiert und die Reflexe überprüft. Als Schmerzmittel wurde Tramal® (10 mg/kg x g/Körpergewicht (Grünenthal GmbH, Aachen)) subkutan injiziert. Anschließend erfolgte die Fixierung und die Desinfektion (Betaisodona® Lösung (Mundipharma

GmbH, Limburg)) des Abdomens. Während der Operation wurde die Narkose mit 2,5 Vol.-% Isofluran bei 1,5 l/min O<sub>2</sub> eingestellt. Entlang der *Linea alba* wurde das Abdomen mit einem 2 cm langen Schnitt eröffnet, der linke laterale Leberlappen ligiert (PET-Faden geflochten, beschichtet (3/0 Polyester-S grün, Catgut GmbH, Markneukirchen)) und reseziert (Abbildung 8) was einer 30 %igen Hepatektomie entspricht. Als Hämostatikum wurde resorbierbare oxidierte Zellulose (Resorba® Cell, Nürnberg) verwendet. Anschließend wurde das Abdomen mit einer 3/0 Naht (PGA-Faden geflochten, beschichtet, resorbierbar (3/0 USP Marlin®, Catgut GmbH, Markneukirchen)) verschlossen und erneut unterhalb des linken Rippenbogens mit einem 1 cm langen Schnitt eröffnet. Die Milz wurde mit Hilfe einer Pinzette exponiert und median ligiert (PET-Faden geflochten, beschichtet (3/0 Polyester-S grün, Catgut GmbH, Markneukirchen)). Mit einer 1 ml Spritze und einer 25G Kanüle wurden 150 µl mit  $7,5 \times 10^5$  undifferenzierten oder 14 Tage hepatogen differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen je Tier bzw. 150 µl Trägerkontrolle HRG langsam über den apikalen Milzpol injiziert (Abbildung 8).

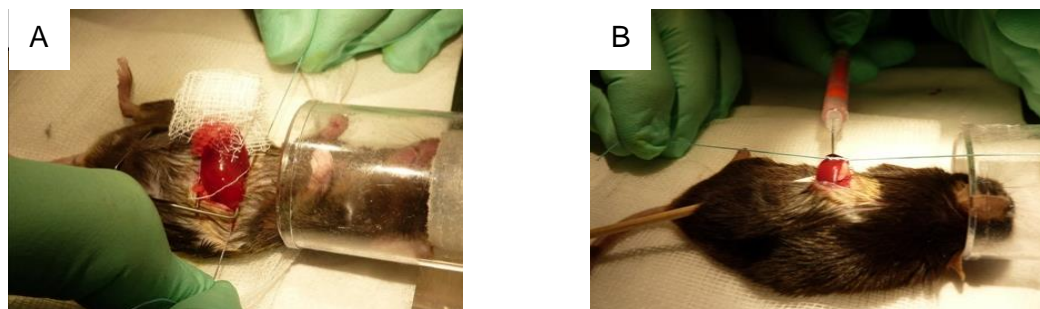


Abbildung 8: Transplantation von Stammzellen in die Maus.

Transplantation der Stammzellen in männliche Pfp/Rag2-Mäuse. (A) zeigt die Ligatur des linken lateralen Leberlappens, (B) zeigt die Injektion der Zellen in den apikalen Pol der Milz. (Stock *et al.* 2010)

Nach Entfernung der Kanüle wurde die Ligatur fest zugezogen, um eine Blutung zu verhindern. Anschließend wurde die Milz zurück in die Abdominalhöhle verlagert, ebenfalls mit Zellulose abgedeckt (Resorba® Cell), mit einer 3/0 Naht (PGA-Faden geflochten, beschichtet, resorbierbar (3/0 USP Marlin®, Catgut GmbH, Markneukirchen)) verschlossen und die Narkose langsam ausgeleitet. Zur Rehydrierung wurde 500 µl 0,9 % NaCl und als Antibiotikum Piperacillin (100 mg/kg x Körpergewicht (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg)) subkutan injiziert. Postoperativ wurde Novaminsulfon (1,33 mg/ml (ratiopharm GmbH, Ulm)) als Schmerzmittel dem Trinkwasser zugesetzt. In Abbildung 9 ist der Operationsverlauf schematisch dargestellt.

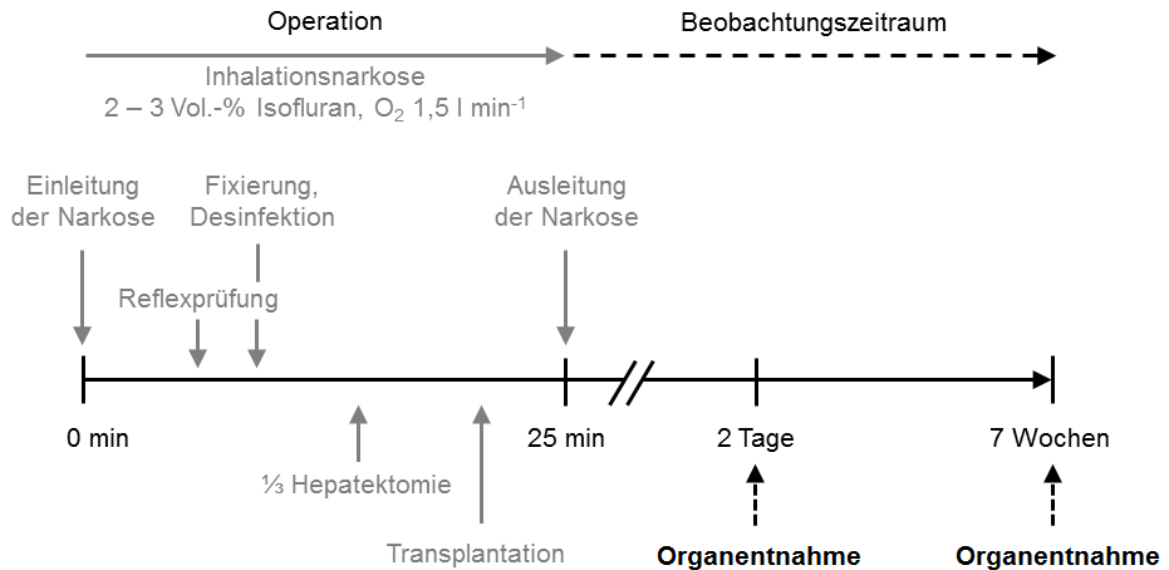


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Operationsverlaufs der Transplantation von ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen.

### 3.3.2 Finale Blut- und Organentnahme

Zur Organentnahme wurde das Versuchstier mit Isofluran narkotisiert (.5 Vol.-% I (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim), O<sub>2</sub>-Flussrate 1,5 l/min). Anschließend wurde das Versuchstier fixiert und die Abdominalhöhle entlang der *Linea alba* eröffnet. Die *Vena cava caudalis* wurde mit einer 25G Kanüle punktiert und das Blut final entnommen. Nach zervikaler Dislokation wurden Leber und Milz entnommen und gewogen.

### 3.4 Bestimmung von Laborparametern im Blutserum

Das entnommene Blut wurde zur Serumgewinnung zentrifugiert (1538 g, 5 min, 4°C (Heraeus™ Fresco™ 21, Thermo Scientific, Dreieich)) und das Blutserum in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt wurde wiederholt und das Serum aliquotiert. Bestimmt wurden die Parameter Aspartat-Aminotransferase (AST), Alanin-Aminotransferase (ALT) und γ-Glutamyl-Transferase (γ-GT), als ein Maß der Leberzellschädigung, sowie die Triglyceride. Die Proben wurden vom Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik der Universität Leipzig analysiert.

### **3.5 Histologische und Immunhistologische Methoden**

#### **3.5.1 Anfertigung von Paraffinschnitten**

Ein Teil des gewonnenen Lebegewebes wurde für 24 h bei 4°C in 4 %iger Formaldehydlösung (Roti®-Histofix (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)) fixiert und bis zur Einbettung in Paraffin in 30 %iger Glucoselösung mit 4 %iger Formaldehydlösung (1:1, Roti®-Histofix) aufbewahrt. Die Proben wurden in die Histokinette (jeweils 2 Stunden: 4 %iges Formalin, zweimal 70 %iger Ethanol, zweimal 96 %iger Ethanol, zweimal absoluter Ethanol, zweimal Xylol, 60°C Paraffin) überführt und anschließend in Paraffin eingebettet. Am Mikrotom (Microm HM 325 (Thermo Scientific, Dreiech)) wurden 1,5 µm dicke Schnitte angefertigt und diese auf silanisierte Objektträger aufgebracht. Bei 52°C wurden die Präparate im Trockenschrank über Nacht getrocknet.

Zur Färbung der Paraffinschnitte wurden diese zunächst in der absteigenden Alkoholreihe bis zum *Aqua dest.* entparaffiniert. Dazu wurden die Schnitte je 2 min in folgende Bäder getaucht: zweimal Xylol, zweimal 96 % Ethanol, 80 % Ethanol, 70 % Ethanol, 50 % Ethanol und abschließend *Aqua dest.*

Nach der Färbung wurden die Präparate mittels aufsteigender Alkoholreihe entwässert. Dazu wurden die Schnitte zu je 2 min in folgende Bäder getaucht: *Aqua dest.*, 50 % Ethanol, 70 % Ethanol, 80 % Ethanol, zweimal 96 % Ethanol, Isopropanol und anschließend zweimal Xylol. Die Präparate wurden abschließend mit Entellan (Merck Millipore GmbH, Schwalbach) eingedeckt.

#### **3.5.2 Hämalaun-Eosin Färbung**

Zur Übersichtsfärbung wurde die Hämalaun-Eosin Färbung benutzt. Die Schnitte wurden in absteigender Alkoholreihe entparaffiniert (vgl. 3.5.1), für 30 sec. in Hämalaun (Meyers Hämalaunlösung (Merck Millipore GmbH, Schwalbach)) inkubiert und 5-10 min mit Leitungswasser gebläut. Anschließend für 3-5 min mit Eosin (Merck Millipore GmbH, Schwalbach) gefärbt, entwässert und mit Entellan (Merck Millipore GmbH, Schwalbach) eingedeckt (vgl. 3.5.1).

### 3.5.3 Nachweis kollagener Fasern mittels Sirius Red-Färbung

Zum Nachweis von kollagenen Fasern in Paraffinschnitten, wurden diese in absteigender Alkoholreihe entparaffiniert (vgl. 3.5.1) und für 60 min in Sirius Red-Lösung (0,1 g Direct red 80 (Alfa Aesar, Karlsruhe); 100 ml Pikrinsäure) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte in 0,5 %iger Essigsäure (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) gewaschen, über die aufsteigende Alkoholreihe entwässert und mit Entellan (Merck Millipore GmbH, Schwalbach) eingedeckt (vgl. 3.5.1). Zur Bestimmung des Kollagengehalts wurden die Schnitte mikroskopiert (Zeiss Axio Imager.A1, Jena).

### 3.5.4 Nachweis der Zellproliferation durch Ki67

Zum immunhistochemischen Nachweis des Proliferationsmarkers Ki67 wurden die Paraffinschnitte mittels absteigender Alkoholreihe entparaffiniert (vgl. 3.5.1) und die Proteine im 10 mM Citratpuffer (9 ml Stammlösung A (10 mM Citronensäure (Merck Millipore GmbH, Schwalbach)); 41 ml Stammlösung B (10 mM Natriumcitrat (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)); 450 ml *Aqua dest.*, pH=6,0) für 45 min demaskiert. Die Schnitte wurden für 30 min auf Eis gekühlt. Es folgte die Blockierung der endogenen Peroxidasen mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dunkel, bei 4°C für 20 min. Nach einem Waschschrift mit PBS wurde fortan in einer feuchten Kammer gearbeitet und es erfolgte die Blockierung mit 5 %iger BSA-Blockierungslösung (5 % bovines Serumalbumin; 0,5 % Tween; gelöst in PBS) für 90 min. Für je 15 min wurden die Schnitte nun mit einer Avidin- und Biotin-Blockierungslösung (Vector-Kit SP-2001 (Vector Laboratories, Burlingame)) inkubiert. Der primäre Antikörper gegen Ki67 (ab66155, abcam, Cambridge UK) wurde 1:200 mit 1 %iger BSA-Lösung (1 % bovines Serumalbumin in PBS) verdünnt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte in PBS gewaschen und für 60 min mit dem sekundären biotinylierten Antikörper (*biotin-SP-conjugated affiniPure goat anti-rabbit IgG* 111-065-003 (Dianova, Hamburg)) mit einer 1:200 Verdünnung in 0,5 %iger BSA-Lösung (0,5 % bovines Serumalbumin in PBS) inkubiert. Die Schnitte wurden erneut mit PBS gewaschen und 30 min mit dem ABC-Reagenz (Vector-Kit PK-6100 (Vector Laboratories, Burlingame)) behandelt. Zur Detektion wurde das Chromogen *Histogreen* (1 min; Kit E-109 (Linaris, Dossenheim)) verwendet, kurz in PBS gewaschen und für 5-8 min mit Kernechtrot gegengefärbt. Abschließend wurden die Schnitte kurz in *Aqua dest.*, 99 %igem Ethanol, Isopropanol und Xylol geschwenkt und mit Entellan (Merck Millipore GmbH, Schwalbach) eingedeckt.

Zur Bestimmung der Proliferationsrate wurden je Tier 10 Bilder in einer 20-fachen Vergrößerung mikroskopiert (Zeiss Axio Imager.A1, Jena) und mittels ImageJ 1.48v (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) die ruhenden und proliferierenden Zellen ausgezählt.

### **3.5.5 Nachweis der undifferenzierten und differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen nach Transplantation in immundefiziente Mäuse**

Zum immunhistochemischen Nachweis der transplantierten humanen ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen in der Empfängermaus wurden die Paraffinschnitte von Leber und Milz mittels absteigender Alkoholreihe entparaffiniert (vgl. 3.5.1) und die Proteine im TRIS/EDTA-Puffer (10 mM TRIS; 1 mM EDTA; pH = 9,0) im Dampfkochtopf für 30 min demaskiert. Die Schnitte wurden 30 min auf Eis gekühlt, 30 min mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dunkel, bei 4°C blockiert und danach mit TBS-Puffer (50 mM TRIS; 150 mM NaCl; pH = 7,4) gewaschen. Es folgte die Inkubation in 5 %iger BSA-Blockierungslösung (5 % bovines Serumalbumin; 0,5 % Tween; gelöst in PBS) für 60 min, bei Raumtemperatur, in einer feuchten Kammer. Für je 15 min wurden die Schnitte anschließend mit einer Avidin- und Biotin-Blockierungslösung (Vector-Kit SP-2001 (Vector Laboratories, Burlingame)) inkubiert. Der primäre Antikörper Ku80 (C48E7) (#2180, Cell Signaling, Danvers) wurde 1:800 mit einer 1 %igen BSA-Lösung (1 % bovines Serumalbumin in TBS) verdünnt, auf die Schnitte gegeben und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte mit TBS gewaschen und für 60 min mit dem sekundären biotinylierten Antikörper (*biotin-SP-conjugated affiniPure goat anti-rabbit IgG* 111-065-003 (Dianova, Hamburg)) in einer 1:200 Verdünnung in 0,5 %iger BSA-Lösung (0,5 % bovines Serumalbumin in TBS) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte erneut gewaschen und 30 min mit dem ABC-Reagenz (Vector-Kit PK-6100 (Vector Laboratories)) inkubiert. Mit dem Chromogen DAB (Pierce™ CN/DAB Substrate Kit (Thermo Scientific, Dreieich)) wurden die Schnitte 3 min inkubiert, kurz in TBS gewaschen und anschließend kurz mit Kernechtrot gegengefärbt. Abschließend wurden die Schnitte kurz in *Aqua dest.*, 99 %igem Ethanol, Isopropanol und Xylol geschwenkt und mit Entellan (Merck Millipore GmbH, Schwalbach) eingedeckt und mikroskopiert (Zeiss Axio Imager.A1, Jena).

### 3.5.6 Anfertigung von Kryoschnitten

Ein Teil des Lebergewebes wurde schonend tiefgefroren und für die Anfertigung von Gefrierschnitten (Kryoschnitten) verwendet, um Lipideinlagerung in den Hepatozyten nachzuweisen. Dazu wurden am Kryostat Microm HM560 (Thermo Scientific, Dreieich), bei einer Temperatur von -22°C 14 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt. O.C.T.™ Compound (Tissue-Tek®, Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen) wurde als Einbettmedium verwendet.

### 3.5.7 Nachweis von Lipiden

Die Gefrierschnitte wurden in PBS gewaschen, 20 min mit Sudan III-Lösung (1 g/100 ml Sudan III (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) in 70 % Ethanol) inkubiert und erneut mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für 1 min in Hämalun (Meyers Hämalunlösung (Merck Millipore GmbH, Schwalbach)) inkubiert, 5-10 min mit Leitungswasser gebläut und mit Kaisers Glyceringelatine (Merck Millipore GmbH, Schwalbach) eingedeckt. Zur semiquantitativen Bestimmung des Lipidgehalts wurden die Schnitte mikroskopiert (Zeiss Axio Imager.A1, Jena) und je Tier 15 Bilder in einer 20-fachen Vergrößerung mittels ImageJ 1.48v (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), *color threshold*, ausgewertet. Dabei wurde der prozentuale Anteil der positiven Areale bestimmt.

### 3.5.8 Immunhistochemischer Nachweis von Makrophagen mit dem anti-F4/80-Antikörper

Zum Nachweis möglicherweise auftretender Entzündungsreaktionen 2 Tage nach der Applikation der Stammzellen wurden Veränderungen der Anzahl an Makrophagen auf Kryoschnitten durch die Detektion des Makrophagen-Oberflächenmarkers F4/80 bestimmt. Die Kryoschnitte wurden zuerst mit einem 1:1 Methanol/Aceton-Gemisch bei -20°C und danach mit 4 % Formaldehyd in PBS bei 4°C für jeweils 10 min fixiert. Die Blockierung der Peroxidasen erfolgte mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dunkel, bei 4°C. Nachdem die Schnitte in PBS mit 0,3 M Glycin in PBS gewaschen wurden, erfolgte eine Blockierung mit 5 %iger BSA-Blockierungslösung (5 % bovines Serumalbumin; 0,5 % Tween; gelöst in PBS) für 60 min. Die Schnitte wurden erneut mit PBS gewaschen. Der primäre Antikörper F4/80 (#MA1-91124, Thermo Scientific, Michigan, USA) wurde 1:1000 mit einer 1 %igen BSA-Lösung (1 % bovines Serumalbumin in PBS) verdünnt und über Nacht bei



4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte in PBS gewaschen und für 60 min mit dem sekundären Antikörper (*rabbit anti-rat IgG* HRP 312-035-003 (Dianova, Hamburg)) in einer 1:200 Verdünnung in 0,5 %iger BSA-Lösung (0,5 % bovines Serumalbumin in PBS) behandelt. Die Schnitte wurden erneut in PBS gewaschen und mit der Detektionslösung DAB (Pierce™ DAB Substrate Kit (Thermo Scientific, Michigan, USA)) 5 min inkubiert. Nach einem Waschschrift in PBS folgte die Gegenfärbung mit Hämalaun für 1 min und das Bläuen mit Leitungswasser für 5 min. Die Schnitte wurden kurz in *Aqua dest.*, 50 %igem Ethanol, 80 %igem Ethanol, zweimal in 96 %igem Ethanol und Xylol für 1 min getaucht und mit Entellan (Merck Millipore GmbH, Schwalbach) eingedeckt. Zur Bestimmung der Anzahl der Makrophagen wurden die Schnitte mikroskopiert (Zeiss Axio Imager.A1) und je Tier 10 Bilder in einer 20-fachen Vergrößerung mittels ImageJ 1.48v (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) ausgezählt.

### 3.6 Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertung wurde mit der Software IBM SPSS Statistics (IBM, Version 24) durchgeführt. Um die einzelnen Variablen für Parentalstammzellen und ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen zu vergleichen, wurde zunächst die Normalverteilung mittels des Kolmogorov-Smirnov Test analysiert. Um Unterschiede zwischen den Gruppen darzustellen, wurde bei vorliegender Normalverteilung der T-Test für unabhängige Stichproben genutzt. Lag keine Normalverteilung vor, wurde der Kruskal-Wallis Test herangezogen. Im Fall der Lipidakkumulation und der Proliferationsrate wurde auf den Mann-Whitney-U Test zurückgegriffen. Das Signifikanzniveau wurde bei  $p < 0,05$  festgelegt. Alle Werte wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SE) präsentiert.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Zellbiologische und biochemische Charakterisierung der undifferenzierten und differenzierten Parentalstammzellen sowie ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen

#### 4.1.1 Adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung

Neben der Plastikadhärenz ist die Differenzierungsfähigkeit in Adipozyten, Osteoblasten und Chondroblasten unter standardisierten Kulturbedingungen eines der Kriterien zur Definition mesenchymaler Stammzellen (MSC) (Dominici *et al.* 2006). Zwei unabhängige repräsentativ ausgewählte Zellpräparationen der Parentalstammzellen und ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen wurden zur Analyse der multiplen Differenzierungsfähigkeit herangezogen. Die Differenzierung in Adipozyten wurde mittels Sudan III (vgl. 3.1.3), die Differenzierung in Osteoblasten durch die Aktivität der alkalischen Phosphatase (vgl. 3.1.4) und die Differenzierung in Chondroblasten mittels *Alcian Blue* (vgl. 3.1.5) nachgewiesen.

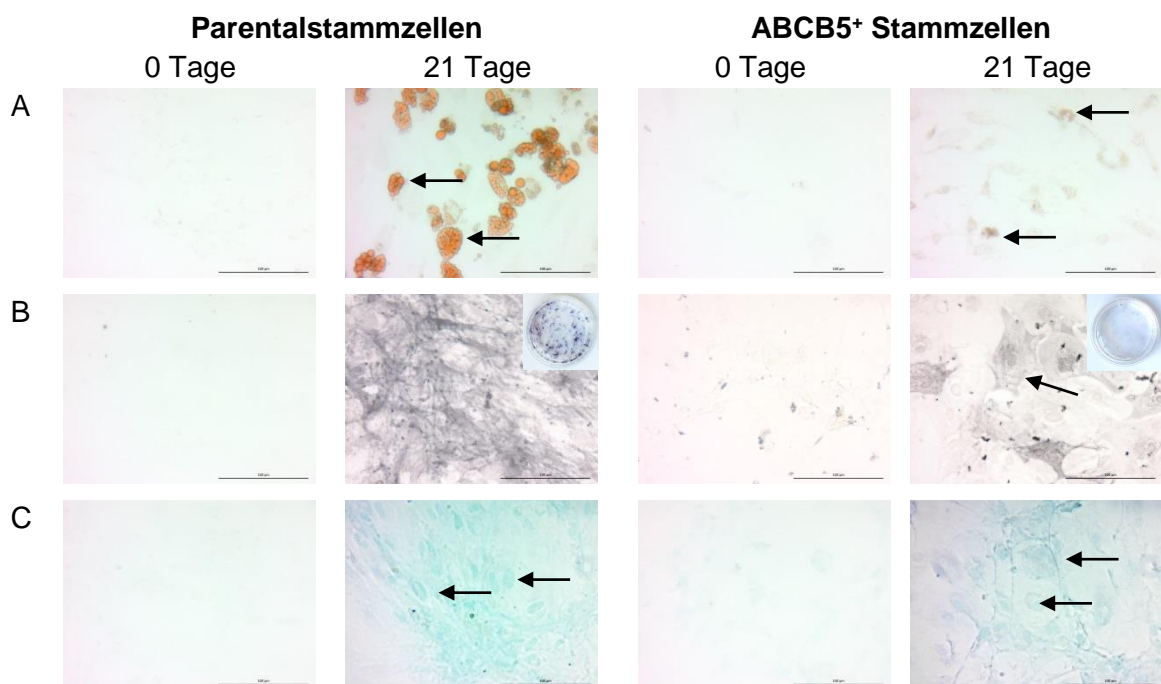


Abbildung 10: Nachweis der multiplen Differenzierungsfähigkeit der adulten Parentalstammzellen (links) und ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen (rechts) der menschlichen Haut.

Die Zellen wurden 21 Tage im (A) adipogenen, (B) osteogenen oder (C) chondrogenen Differenzierungsmedium kultiviert. Die Differenzierung wurde mittels Lipideinlagerung [Sudan III-Färbung (orange) in A], Aktivität der alkalischen Phosphatase [BCIP-Lösung (grau) in B] und Knorpelbildung [*Alcian Blue*-Färbung (blau) in C] nachgewiesen. Die undifferenzierten Zellen (0 Tage) wurden als Kontrolle verwendet. Dargestellt sind repräsentative Bildausschnitte (n = 2) zum Zeitpunkt 0 Tage und nach 21 Tagen Differenzierung sowie eine makroskopische Aufnahme der Zellkulturschale der osteogen differenzierten Stammzellen. Die Pfeile zeigen auf entsprechend differenzierte Zellen. Skalierung: 100 µm

Nach 21 Tagen Kultivierung in den entsprechenden Differenzierungsmedien (vgl. 3.1.2) konnte in den Parentalstammzellen eine adipogene, osteogene sowie chondrogene Differenzierung nachgewiesen werden (Abbildung 10 A-C). Die selektionierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen zeigten im direkten Vergleich eine weniger ausgeprägte Differenzierung. Nur wenige Zellen differenzierten in die entsprechenden Richtungen. Insbesondere bei der adipogenen Differenzierung waren Lipideinlagerung nach 21 Tagen nur im Anfangsstadium erkennbar (Abbildung 10 A-C). Folglich wiesen bei Anwendung der vorliegenden Protokolle die Parentalstammzellen ein deutlich besseres Differenzierungspotential als die selektionierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen auf.

### 4.1.2 Nachweis der hepatogenen Differenzierung

Untersuchungen der Arbeitsgruppe „Angewandte Molekulare Hepatologie“ hatten gezeigt, dass sich hepatogen differenzierte MSC im Vergleich zu undifferenzierten MSC signifikant besser im Parenchym einer Empfängerleber integrierten. Dies könnte ihr therapeutisches Potential deutlich steigern (Aurich *et al.* 2009). Deshalb wurde die Fähigkeit der Parentalstammzellen und der ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen in hepatozytäre Zellen zu differenzieren untersucht.

Nachweise zur möglichen hepatozytären Differenzierung sind u.a. die Änderung der Morphologie, die Hepatozyten ähnlich ist, sowie die Akkumulation von Glykogen im Laufe der hepatogenen Differenzierung (Aurich *et al.* 2007; Banas *et al.* 2007).

Die Zellmorphologie der Parentalstammzellen und ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen war im undifferenzierten Zustand spindelförmig und fibroblastenartig (Abbildung 11). Deutlich zu erkennen ist, dass die Zellen trotz der Behandlung mit 5'-Azacytidin weiterhin stark proliferierten. Während der hepatogenen Differenzierung für 21 Tage blieb die Morphologie der Parentalstammzellen und ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen weitestgehend unverändert spindelförmig und fibroblastenartig (Abbildung 11). Typische hepatozytäre Merkmale, wie die polygonale Form der Zellen oder Mehrkernigkeit, konnten in beiden Stammzellpopulationen nicht nachgewiesen werden.

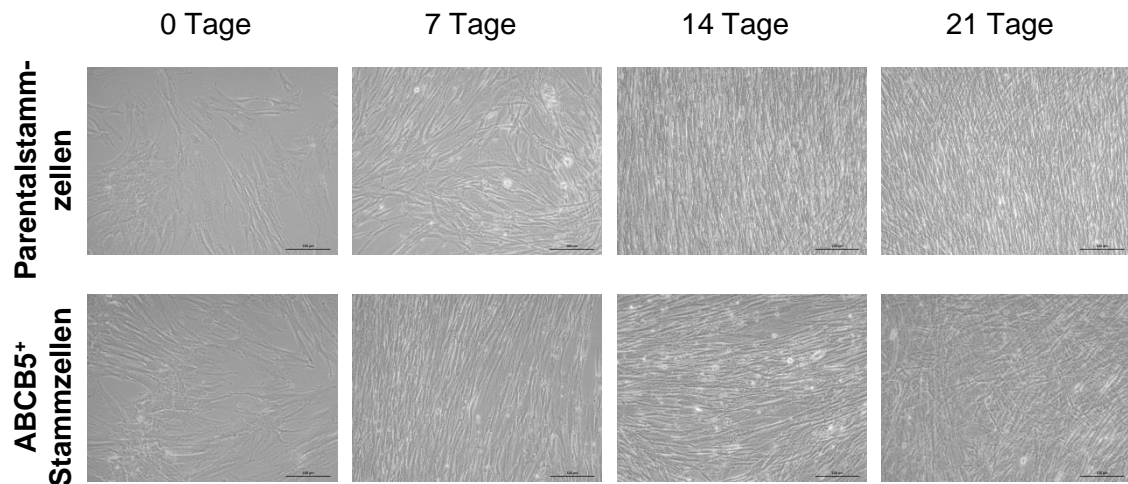


Abbildung 11: Repräsentative Bildausschnitte (n = 2) zur Dokumentation der Zellmorphologie während der hepatogenen Differenzierung von adulten Parentalstammzellen und ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen der menschlichen Haut.

Parentalstammzellen und ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen wurden 21 Tage im hepatogenen Differenzierungsmedium kultiviert. Dargestellt sind Bildausschnitte von Parentalstammzellen (obere Bilderreihe) und ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen (untere Bilderreihe) zu den Zeitpunkten 0 Tage, 7 Tage, 14 Tage und 21 Tage im Differenzierungsmedium. Skalierung: 100  $\mu$ m

Die Synthese und Einlagerung von Glykogen ist eine wesentliche Aufgabe von Hepatozyten. Kohlenhydrathaltige Polymere, wie Glykogen, können mittels PAS-Reaktion (vgl. 3.1.6) qualitativ nachgewiesen werden. Wie makroskopisch zu sehen war, konnte eine kolonieartige Färbung sowohl in den Parentalstammzellen als auch in den ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen nachgewiesen werden. Bei mikroskopischer Betrachtung war zu erkennen, dass Glykogeneinlagerungen in einzelnen Zellen bereits nach 7 Tagen der Differenzierung nachgewiesen werden konnten (Abbildung 12). Nach 21 Tagen hepatogener Differenzierung war dennoch nur in sehr wenigen Zellen Glykogen nachweisbar. Unter Berücksichtigung der unveränderten Morphologie und der geringen Einlagerung von Glykogen war unklar, ob eine Differenzierung in hepatozytäre Zellen stattgefunden hatte. Daher wurden weitere funktionelle und biochemische Analysen durchgeführt, um die mögliche Differenzierung der Zellen in hepatozytäre Zellen zu untersuchen (s. 4.1.4 und 4.1.5).

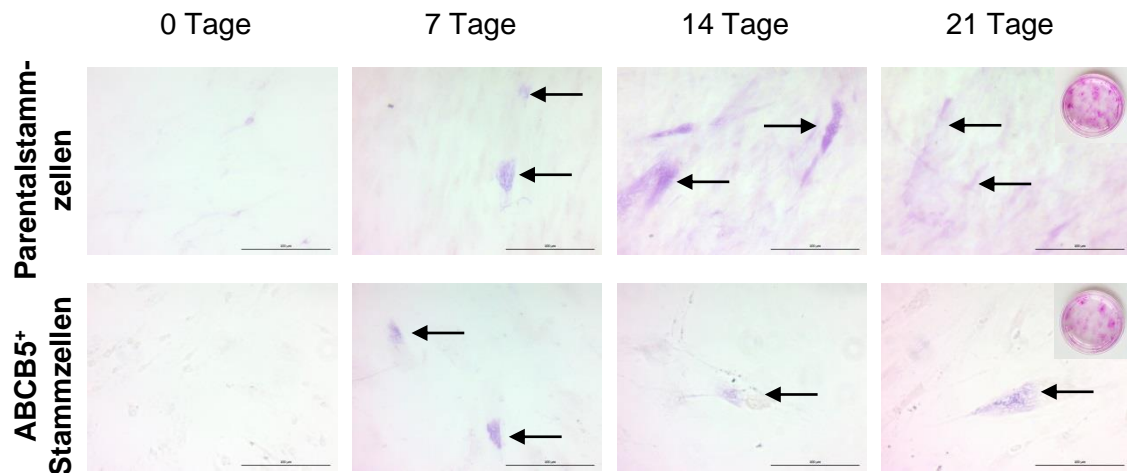


Abbildung 12: Repräsentative Bildausschnitte ( $n = 4$ ) der Einlagerung von Glykogen in den adulten Parentalstammzellen und ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen der menschlichen Haut während der hepatogenen Differenzierung.

Parentalstammzellen und ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen wurden 21 Tage im hepatogenen Differenzierungsmedium kultiviert. Glykogeneinlagerungen wurden mittels PAS-Reaktion (pink) nachgewiesen (Pfeile). Die undifferenzierten Zellen (0 Tage) wurden als Kontrolle verwendet. Dargestellt sind Bildausschnitte zu den Zeitpunkten 0 Tage, 7 Tage, 14 Tage und 21 Tage im Differenzierungsmedium sowie zwei makroskopische Aufnahmen der Zellkulturschale [Inserts] zur Dokumentation der kolonieartigen Färbung. Skalierung: 100 µm

#### 4.1.3 Expression von Oberflächenmarkern

Mesenchymale Stammzellen exprimieren *per definitionem* ein spezifisches Profil von Oberflächenmarkern (Dominici *et al.* 2006). Um den mesenchymalen Stammzellcharakter der Parentalstammzellen und ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen zu belegen, wurde dieses Profil hier untersucht. Die hämatopoetischen Oberflächenmarker CD14, CD34 sowie CD45 werden nicht von MSC exprimiert. Die Oberflächenmarker CD90 und CD105 sollen jedoch von mehr als 95 % der Zellen exprimiert werden (Dominici *et al.* 2006). Neben diesen wurden weitere Marker, wie z.B. der Transferrinrezeptor CD71, der die hepatogene Differenzierung anzeigen würde, analysiert. In Tabelle 14 sind die jeweiligen Mittelwerte mit Standardabweichung der analysierten Oberflächenmarker, angegeben in % positive Zellen, zu den Zeitpunkten 0 Tage (undifferenziert) und 21 Tage differenziert, zusammengefasst.

Tabelle 14: Expressionsprofil der analysierten Oberflächenmarker im Laufe der hepato-genen Differenzierung von undifferenzierten und 21 Tage differenzierten adulten Parentalstammzellen und ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen der menschlichen Haut.<sup>1</sup>

	Parentalstammzellen		ABCB5 <sup>+</sup> Stammzellen	
	0 Tage	21 Tage	0 Tage	21 Tage
<b>Hämatopoetische Oberflächenmarker [% positive Zellen]</b>				
CD14	0,25 ± 0,31	3,43 ± 4,96	0,45 ± 0,35	1,53 ± 0,73*
CD34	0,00 ± 0,00	7,20 ± 4,30*	0,00 ± 0,00	8,17 ± 9,77*
CD45	0,40 ± 0,67	0,00 ± 0,00	3,27 ± 5,21	0,00 ± 0,00*
<b>Mesenchymale Stammzellmarker [% positive Zellen]</b>				
CD29	99,97 ± 0,05	99,97 ± 0,05	100,0 ± 0,00	99,93 ± 0,05*
CD90	99,97 ± 0,05	100,0 ± 0,00	100,0 ± 0,00	99,95 ± 0,06
CD105	99,95 ± 0,10	99,43 ± 0,38*	99,88 ± 0,13	97,68 ± 1,66*
<b>Sonstige Oberflächenmarker [% positive Zellen]</b>				
CD13	99,78 ± 0,45	99,80 ± 0,34	100,0 ± 0,00	99,63 ± 0,62*
CD44	100,0 ± 0,00	99,97 ± 0,05	100,0 ± 0,00	99,97 ± 0,05
CD54	49,90 ± 15,29	81,55 ± 10,37*	60,88 ± 16,27	70,75 ± 15,22
CD71	69,22 ± 19,11	76,78 ± 14,75	80,28 ± 14,37	71,88 ± 22,48
CD166	99,75 ± 0,37	87,43 ± 5,70*	99,72 ± 0,17	84,55 ± 7,11*

<sup>1</sup>Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung (SE); n = 4; \*p < 0,05

Sowohl die undifferenzierten, als auch hepato-gen differenzierte Parentalstammzellen sowie die ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen exprimierten typische mesenchymale Stammzellmarker (CD29, CD90 und CD105 (Abbildung 13)) auf ihrer Zelloberfläche. CD29 und CD90 blieben bei beiden Populationen während der Differenzierung unverändert und wurden zu jedem Zeitpunkt von > 95 % der Zellen exprimiert. Der Anteil an CD105-positiven Zellen der Parentalstammzellen und der ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen war nach 21 Tagen hepato-gener Differenzierung gegenüber den undifferenzierten Zellen geringfügig aber signifikant (p < 0,05) gesunken, wurde jedoch ebenfalls von > 95 % der Zellen expri-miert. Der Oberflächenmarker CD13 wurde in den undifferenzierten Zellen beider Popu-lationen exprimiert, blieb während der hepato-genen Differenzierung in den Parentalstammzellen unverändert und war in den ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen geringfügig, aber signifikant (p < 0,05), gesunken. Zum undifferenzierten Zeitpunkt und nach der hepato-genen Differenzierung lag die Expression von CD13 in beiden Populationen

> 95 %. CD44 blieb bei beiden Populationen während der Differenzierung unverändert und wurde zu jedem Zeitpunkt von > 95 % der Zellen exprimiert. Der Oberflächenmarker CD71, der Transferrinrezeptor, blieb ebenfalls bei beiden Populationen während der Differenzierung unverändert (Abbildung 13).

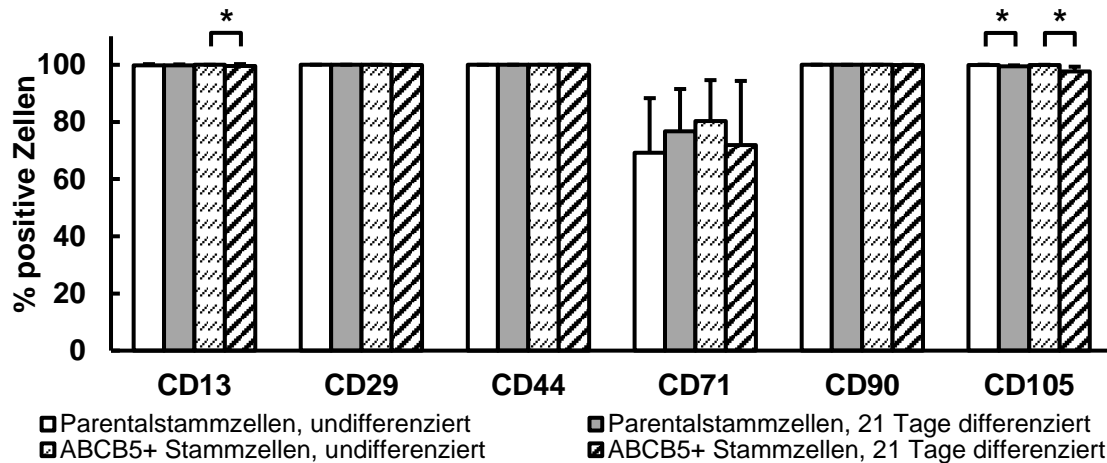


Abbildung 13: Durchflusszytometrische Analyse von undifferenzierten und 21 Tage differenzierten adulten Parentalstammzellen und ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen der menschlichen Haut.

Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SE); n = 4; \*p < 0,05

Die hämatopoetischen Marker CD14, CD34 und CD45 (Abbildung 14) wurden hingegen sowohl auf undifferenzierten als auch auf hepatogen differenzierten Stammzellen sehr geringfügig exprimiert, sollten bei mesenchymalen Stammzellen jedoch  $\leq 2\%$  liegen (Dominici et al. 2006). Es zeigte sich, dass der hämatopoetische Stammzellmarker CD34 nach 21 Tagen hepatogener Differenzierung in den Parentalstammzellen gegenüber den undifferenzierten Zellen signifikant (p < 0,05) angestiegen war, und in > 2 % der Zellen exprimiert wurde. Die hämatopoetischen Marker CD14 und CD45 blieben in den Parentalstammzellen hingegen unverändert, wobei CD14 nach der Differenzierung von > 2 % der Zellen exprimiert wurde (Abbildung 14). In den ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen waren die hämatopoetischen Marker CD14 und CD34 gegenüber den undifferenzierten Zellen signifikant (p < 0,05) gestiegen und wurden am Tag 21 der hepatogenen Differenzierung von > 2 % der Zellen exprimiert. CD45 war in ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen hingegen signifikant (p < 0,05) gesunken und wurde nur zum undifferenzierten Zeitpunkt von > 2 % der Zellen (Abbildung 14) exprimiert.

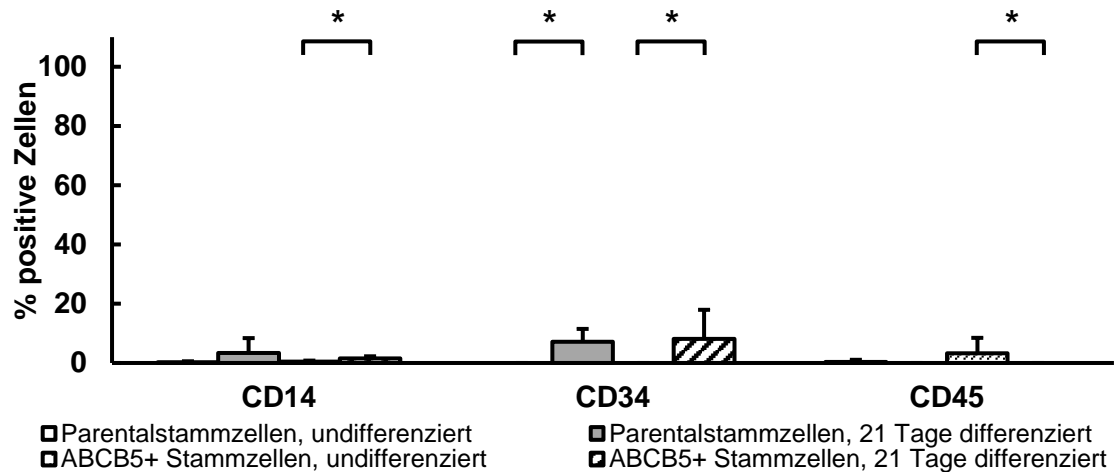


Abbildung 14: Durchflusszytometrische Analyse von undifferenzierten und 21 Tage differenzierten adulten Parentalstammzellen und ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen der menschlichen Haut.

Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SE); n = 4; \*p < 0,05

Der Oberflächenmarker CD54, ICAM 1, zeigte nach der hepatogenen Differenzierung eine signifikant (p < 0,05) höhere Expression in den Parentalstammzellen, jedoch nicht in den ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen gegenüber den undifferenzierten Stammzellen (Abbildung 15). Die Expression des Oberflächenmarkers CD166 (Abbildung 15) ist in beiden Populationen signifikant (p < 0,05) gegenüber den undifferenzierten Stammzellen gesunken.

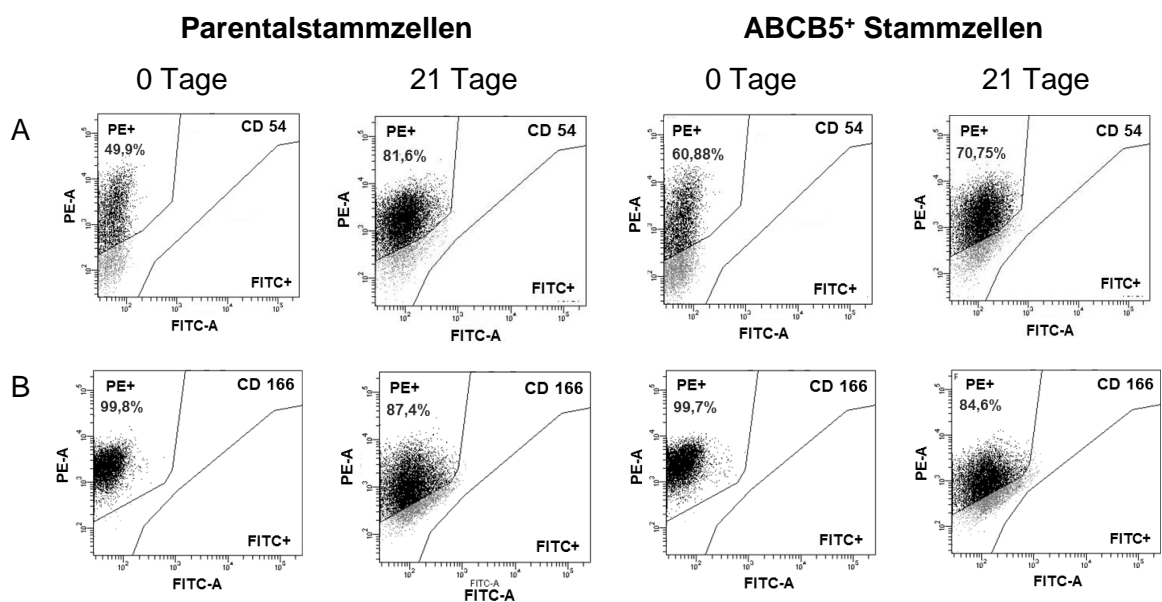


Abbildung 15: Repräsentative FACS dot plots (n = 4) der Oberflächenmarker CD54 (A) und CD166 (B) von undifferenzierten und 21 Tage differenzierten adulten Parentalstammzellen und ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen der menschlichen Haut.



Unter Berücksichtigung der Kriterien der *International Society for Cellular Therapy* für das Oberflächenmarkerprofil von MSC handelt es sich bei den undifferenzierten Parentalstammzellen um mesenchymale Stammzellen. Die ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen wiesen ein ähnliches Expressionsprofil auf, zeigten jedoch eine erhöhte Expression des hämatopoetischen Markers CD34 und wichen damit von den Kriterien zur Definition von MSC ab. Im Laufe der hepatogenen Differenzierung zeigten sich zum Teil geringe, dennoch signifikante Änderungen im Expressionsprofil beider Stammzellpopulationen. Die Zunahme von CD54 und die Abnahme von CD166 (Abbildung 15) während der hepatogenen Differenzierung wurde auch in früheren Arbeiten gezeigt (Winkler *et al.* 2016) und könnte somit ein Hinweis auf die Differenzierung der Parentalstammzellen und ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen in hepatozytäre Zellen darstellen.

#### 4.1.4 Funktioneller Nachweis leberspezifischer Stoffwechselleistungen

Die hepatogene Differenzierung der Parentalstammzellen und ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen sollte weiterhin anhand funktioneller Merkmale von Hepatozyten nachgewiesen werden. Wesentliche Funktionen sind u.a. die Synthese von Harnstoff zur Ammoniakentgiftung sowie die Metabolisierung von endo- und exogenen Substanzen (Fremdstoffmetabolismus) (Sobotta & Welsch 2003).

Hinsichtlich der Harnstoffsyntheserate konnten keinerlei signifikante Unterschiede zwischen Parentalstammzellen und ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen, undifferenziert und hepatogen differenziert festgestellt werden (Abbildung 16).

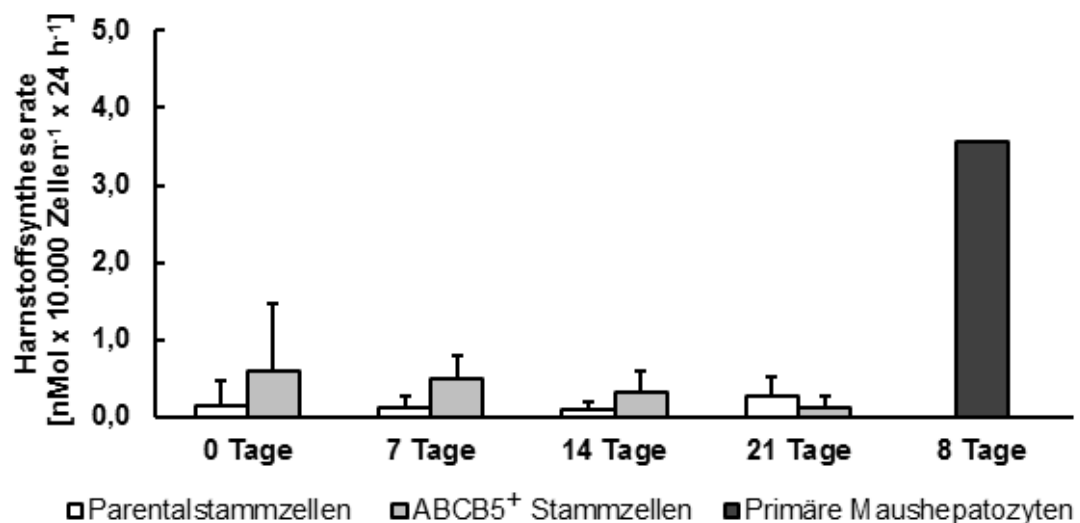


Abbildung 16: Harnstoffsyntheserate von undifferenzierten und differenzierten adulten Parentalstammzellen und ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen der menschlichen Haut.

8 Tage kultivierte primäre Maushepatozyten dienten als Positivkontrolle.

Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung; n = 4

Die höchste Harnstoffsyntheserate (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; n = 4) für die Parentalstammzellen betrug  $0,27 \pm 0,26$  nmol  $\times 10.000$  Zellen<sup>-1</sup>  $\times 24$  h<sup>-1</sup> am Tag 21 der hepatogenen Differenzierung und für die undifferenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen  $0,60 \pm 0,88$  nmol  $\times 10.000$  Zellen<sup>-1</sup>  $\times 24$  h<sup>-1</sup> am Tag 0. Die gemessenen Harnstoffkonzentrationen sind als marginal anzusehen und wesentlich geringer als die von 8 Tage kultivierten, primären Maushepatozyten.

Die Untersuchung zum Fremdstoffmetabolismus in den Parentalstammzellen ergab während der hepatogenen Differenzierung keine signifikanten Veränderungen der Enzymaktivität von CYP1A1. Die Enzymaktivität von CYP1A1 in den ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen war zum Zeitpunkt 7 Tage, 14 Tage und 21 Tage der Differenzierung gegenüber dem Zeitpunkt 0 Tage (undifferenziert) zwar signifikant gestiegen, war aber ca. um den Faktor 100 niedriger als in 8 Tage kultivierten primären Maushepatozyten (Abbildung 17). Die höchste Enzymaktivität von CYP1A1 (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; n = 4) für die Parentalstammzellen betrug  $0,45 \pm 0,49$  pmol  $\times 10.000$  Zellen<sup>-1</sup>  $\times 24$  h<sup>-1</sup> und für die ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen  $2,01 \pm 2,93$  pmol  $\times 10.000$  Zellen<sup>-1</sup>  $\times 24$  h<sup>-1</sup> jeweils am Tag 14 der hepatogenen Differenzierung.

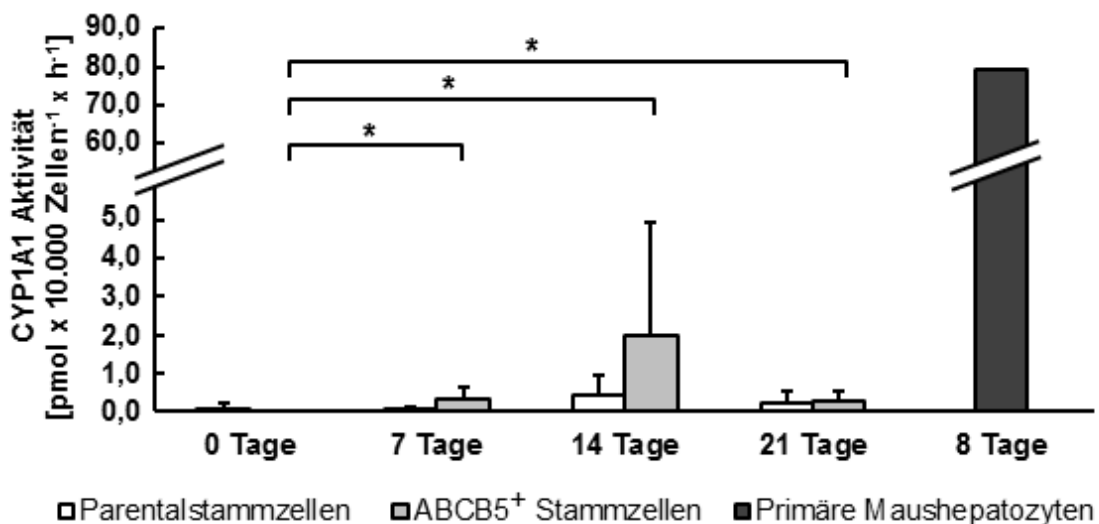


Abbildung 17: CYP1A1 Aktivität in undifferenzierten und differenzierten adulten Parentalstammzellen und ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen der menschlichen Haut.

8 Tage kultivierte primäre Maushepatozyten dienten als Positivkontrolle.

Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SE); n = 4; \*p < 0,05

Die Enzymaktivität von CYP2B1 zeigte weder in den Parentalstammzellen noch in den ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen signifikante Veränderungen. Im Vergleich zu 8 Tage kultivierten, primären Maushepatozyten war auch hier die Enzymaktivität während der hepatogenen Differenzierung sehr gering (Abbildung 18).

Die höchste Enzymaktivität von CYP2B1 (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; n = 4) in den Parentalstammzellen betrug  $0,72 \pm 0,64$  pmol x 10.000 Zellen<sup>-1</sup> x 24 h<sup>-1</sup> und für die ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen  $0,91 \pm 1,71$  pmol x 10.000 Zellen<sup>-1</sup> x 24 h<sup>-1</sup> jeweils zum Zeitpunkt 0 Tage (undifferenziert).

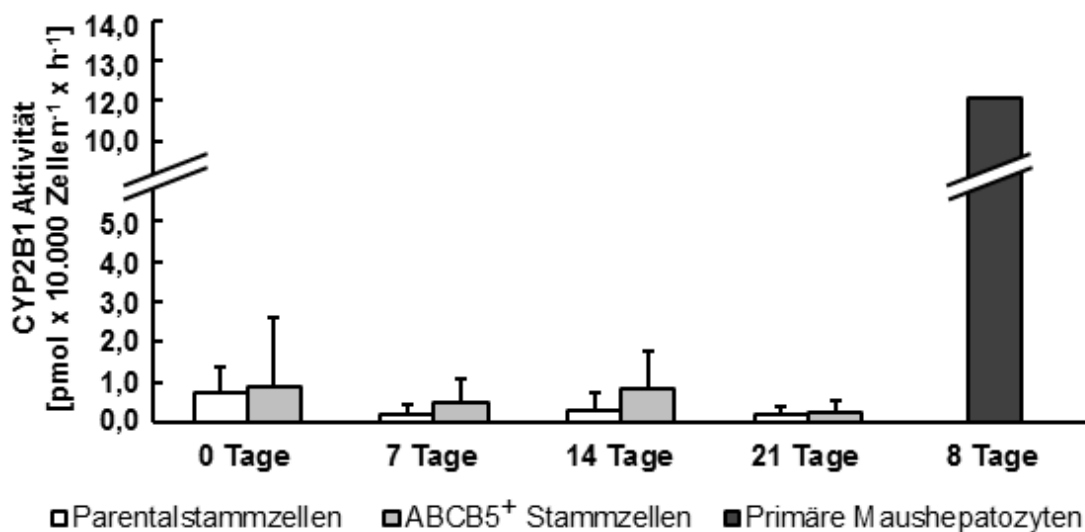


Abbildung 18: CYP2B1 Aktivität in undifferenzierten und 21 Tage differenzierten adulten Parentalstammzellen und ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen der menschlichen Haut. 8 Tage kultivierte primäre Maushepatozyten dienen als Positivkontrolle. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SE); n = 4

Zusammenfassend zeigte sich, dass nach dem vorliegenden Protokoll weder die Parentalstammzellen noch die ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen Maushepatozyten vergleichbare, funktionelle Merkmale im Laufe der hepatogenen Differenzierung entwickelten.

#### 4.1.5 Expression leberspezifischer Gene

Um zu überprüfen, ob die Anwendung des hier verwendeten Protokolls zur hepatogenen Differenzierung von MSC bei adulten Parentalstammzellen und ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen der menschlichen Haut überhaupt Veränderungen hinsichtlich hepatozytärer Eigenschaften hervorrief, wurde die Expression von leberspezifischen Genen in den Stammzellen auf transkriptioneller Ebene untersucht. Es wurden im Verlauf der hepatogenen

Differenzierung zu den Zeitpunkten 0 Tage (undifferenziert), 7 Tage, 14 Tage und 21 Tage sowohl hepatozytäre als auch biliäre sowie mesenchymale Marker mittels semi-quantitativer RT-PCR analysiert. Zur Kontrolle der Intaktheit der isolierten RNA wurde mit repräsentativen Proben eine Agarose-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt.

Es zeigte sich, dass sowohl die 28S als auch die 18S rRNA intakt waren, so dass sich somit die Methode zur Isolierung der Gesamt-RNA aus den Stammzellen als zuverlässig erwies (Abbildung 19).

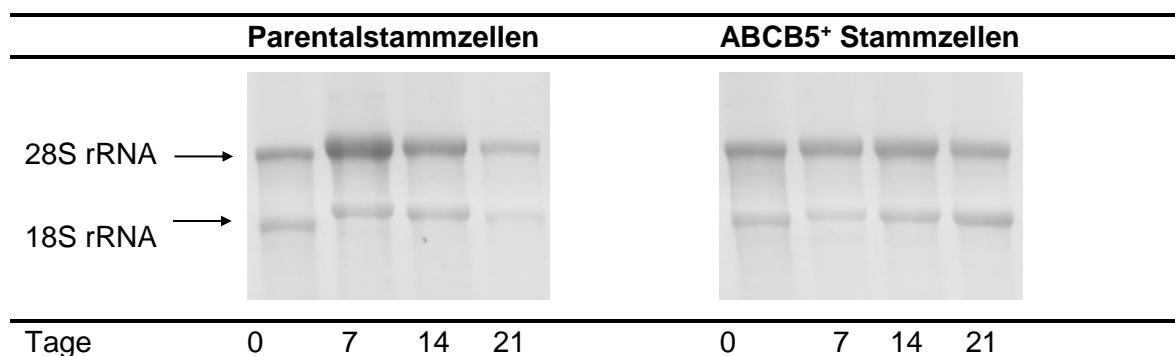


Abbildung 19: Dokumentation der Intaktheit der im Verlauf der hepatogenen Differenzierung aus adulten Parentalstammzellen und ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen der menschlichen Haut isolierten Gesamt-RNA.

Parentalstammzellen und ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen wurden 21 Tage im hepatogenen Differenzierungsmedium kultiviert. Dargestellt sind repräsentative RNA-Proben (n = 4) aus Parentalstammzellen und ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen zum Zeitpunkt 0 Tage, 7 Tage, 14 Tage und 21 Tage der Differenzierung.

Als Positivkontrolle diente RNA aus drei unterschiedlichen humanen Leberproben. Zur Normalisierung der RNA-Mengen in den unterschiedlichen RNA-Proben wurde das Haushaltsgen Cyclophilin A verwendet. In Abbildung 20 sind die PCR-Produkte der untersuchten Gene aus repräsentativen RNA-Proben dargestellt. Abbildung 21 zeigt die grafische Darstellung der semi-quantitativen Auswertung der untersuchten RNAs nach Normalisierung bezogen auf die Cyclophilin A-Expression.

Auch wenn die repräsentativen Bilder der Gelelektrophorese Veränderungen anzeigten, so wurden diese aber durch die Normalisierung auf das Haushaltsgen vielfach ausgeglichen, so dass sich kaum signifikante Veränderungen der RNA-Menge mit hepatozytärer Differenzierung ergaben.

	Parentalstammzellen				ABCB5 <sup>+</sup> Stammzellen				Humane Leber
Albumin									
CK 7									
CK 18									
CK 19									
CPS I									
CYP 3A4									
GS									
HNF 4									
α-SMA									
Cyc A									
Tage	0	7	14	21	0	7	14	21	

Abbildung 20: Dokumentation der PCR-Produkte von repräsentativen Proben während der hepatogenen Differenzierung von adulten Parentalstammzellen und ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen der menschlichen Haut.

Parentalstammzellen und ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen wurden für 21 Tage im hepatogenen Differenzierungsmedium kultiviert. Dargestellt sind die PCR-Produkte repräsentativer Zellpräparationen (n = 4) von Parentalstammzellen und ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen zum Zeitpunkt 0 Tage, 7 Tage, 14 Tage und 21 Tage Differenzierung. Humane Leber diente als Positivkontrolle. Zur Normalisierung wurde das Haushaltsgen Cyclophilin A verwendet.

CK, Cytokeratin; CPS I, Carbamoylphosphat-Synthetase I; Cyc A, Cyclophilin A; CYP, Cytochrom P450; GS, Glutamin-Synthetase; HNF4, *hepatocyte nuclear factor 4*; α-SMA, *α smooth muscle actin*

Die untersuchten hepatozytären Marker, wie das Plasmaprotein Albumin, die Carbamoylphosphat-Synthetase I, das Kontrollenzym des Harnstoffzyklus, Cytochrom P450 3A4, ein Enzym des Fremdstoffmetabolismus, die Glutamin-Synthetase, ein Enzym der Ammoniakfixierung sowie der leberspezifische Transkriptionsfaktor *hepatocyte nucleare factor 4* (HNF4) zeigten keine signifikanten Änderungen in der Expression der mRNA während der hepatogenen Differenzierung. Weder in Parentalstammzellen noch in ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen (Abbildung 21).

Der epitheliale Marker Cytokeratin 18 war ebenfalls im Verlaufe der hepatogenen Differenzierung nicht verändert, zeigte aber nach 21 Tagen hepatogener Differenzierung in den ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen gegenüber den Parentalstammzellen eine signifikant niedrigere Expression (p < 0,005; Abbildung 21).

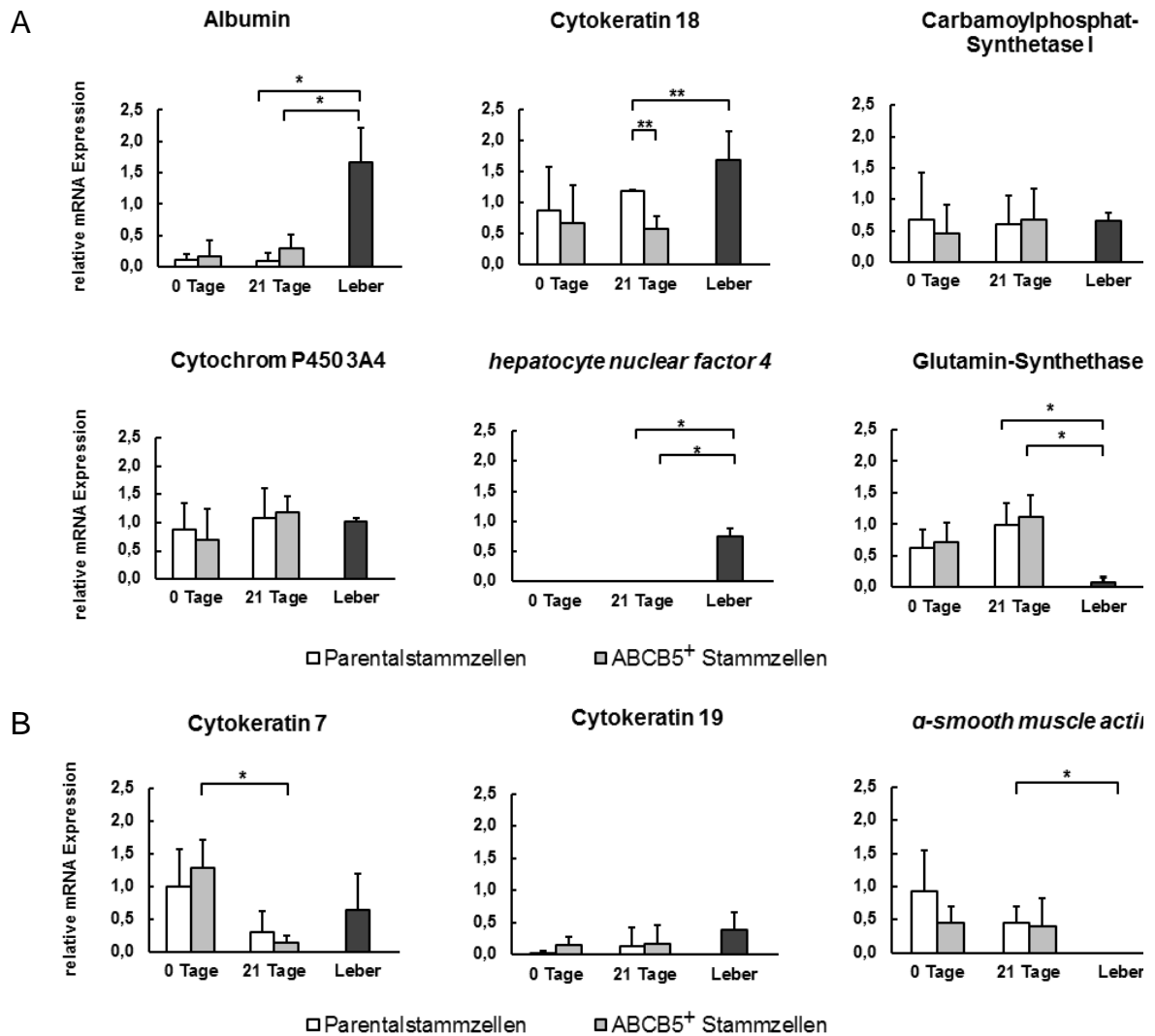


Abbildung 21: Relative mRNA Expression von hepatozytenspezifischen (A) sowie biliären und mesenchymalen Markern (B) während der hepatogenen Differenzierung von adulten Parentalstammzellen und ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen der menschlichen Haut. Die Analyse erfolgte mittels RT-PCR. Dargestellt sind Expressionsprofile von Parentalstammzellen (weiße Säulen) und ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen (hellgraue Säulen) zum Zeitpunkt 0 Tage und 21 Tage Differenzierung. Humane Leber diente als Positivkontrolle (dunkelgraue Säulen). Zur Normalisierung wurde das Haushaltsgen Cyclophilin A verwendet. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SE); n = 4; \*p < 0,05; \*\*p < 0,005

Neben den hepatozytenspezifischen Markern wurden auch biliäre und mesenchymale Marker analysiert. Die Cytokeratine 7 und 19 werden in biliären Zellen und ebenfalls in Progenitorzellen der Hepatozyten exprimiert. Die Expression von Cytokeratin 7 sank in den ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen während der hepatogenen Differenzierung signifikant (p < 0,05). Die Expression von Cytokeratin 19 war nach 7 Tagen der Differenzierung in ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen signifikant gestiegen (p < 0,05), zeigte danach jedoch keine weitere Änderung mehr. In den Parentalstammzellen war die Expression der mRNA von Cytokeratin 7 und Cytokeratin 19 unverändert im Kulturverlauf.

Der mesenchymale Marker  *$\alpha$ -smooth muscle actin* ( $\alpha$ -SMA) zeigte ebenfalls keine signifikante Änderung der Expression in den Parentalstammzellen und ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen (Abbildung 21).

Insgesamt nahm die Expression leberspezifischer Gene auf RNA-Ebene tendenziell, jedoch nicht signifikant zu. Wenn auch die relativen RNA-Mengen für einige Gene im Bereich der humanen Lebern lagen, so zeigte sich doch auch hier, dass mit dem vorliegenden Protokoll keine Zunahme der hepatogenen Differenzierung der humanen Stammzellen erreicht wurde.

### 4.2 Analyse des Sekretoms von undifferenzierten und differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen

Stammzellen sezernieren Botenstoffe wie Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren. Mit diesen kommunizieren sie parakrin und/oder im direkten Zell-Zell Kontakt mit Zellen umliegender Gewebe. In einer früheren Arbeit der Arbeitsgruppe „Angewandte Molekulare Hepatologie“ wurde gezeigt, dass die hepatogene Differenzierung von MSC zu signifikanten Veränderungen des Sekretionsprofils hepatotroper Faktoren führte (Winkler et al. 2016, Christ et al. 2015). Deshalb wurde hier zur weiteren Charakterisierung der biologischen Eigenschaften der Stammzellen deren Sekretom analysiert. Mittels des *Proteome Profiler™ Cytokine Array* Kit können 102 Zytokine detektiert werden. Als Schwellenwert für die untere Nachweisgrenze wurde eine relative Lichtintensität von 5 % festgelegt. Die semi-quantitative Auswertung der Sekretomanalyse mit den jeweiligen Mittelwerten und Standardabweichung, zu den Zeitpunkten 0 Tage (undifferenziert) und 14 Tage differenziert, ist in Tabelle 14 zusammengefasst (Einzelwerte vgl. Anlage 2). Zur Normalisierung der Werte wurden die relativen Mengen der gemessenen Zytokine auf 750.000 Zellen bezogen. Diese Zellzahl wurde gewählt, weil sie der Menge an Zellen entsprach, die in den unten beschriebenen Versuchen im Tiermodell verwendet wurde. Über der unteren Nachweisgrenze von 5 % wurden von den undifferenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen 13 Zytokine und von den hepatogen differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen 17 Zytokine sezerniert. Eine grafische Auswertung der ermittelten Werte ist Abbildung 22 zu entnehmen.

Nach der hepatogenen Differenzierung sind die drei sezernierten Zytokine Dickkopf 1, Thrombospondin 1 und uPAR (*urokinase plasminogen activator receptor*) signifikant gesunken ( $p < 0,05$ ). Die sieben Zytokine Chitinase 3-like 1, GDF-15 (*growth differentiation factor 15*), GRO  $\alpha$  (*growth related oncogenes*), HGF (*hepatocyte growth factor*),

IGFBP 2 (*insulin-like growth factor-binding protein 2*), MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*) und VCAM 1 (*vascular cell adhesion protein 1*) wurden hingegen von den differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen signifikant stärker sezerniert ( $p < 0,05$ ). Die Zytokine Angiogenin, DPP4 (Dipeptidylpeptidase 4), EMMPRIN (Basigin), ENA 78 (*epithelial-derived neutrophil activating peptide 78*), Interferon  $\gamma$ , Interleukin 8, Interleukin 17A, MIF (*macrophage migration inhibitory factor*), Pentraxin 3, SDF-1 $\alpha$  (*stromal cell-derived factor 1 $\alpha$* ) und Serpin E1 zeigten keine signifikanten Veränderungen während der Differenzierung.

Tabelle 15: Sekretomprofil der analysierten undifferenzierter und 14 Tage hepatogen differenzierter adulten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen der menschlichen Haut.

Name	ABCB5 <sup>+</sup> Stammzellen [% x 750.000 Zellen <sup>-1</sup> ]	
	undifferenziert	14 Tage hepatogen differenziert
Angiogenin	19,9 $\pm$ 11,0	18,6 $\pm$ 2,4
Chitinase 3-like 1	0,9 $\pm$ 1,3	20,9 $\pm$ 3,0*
Dickkopf-1	35,2 $\pm$ 7,5	1,6 $\pm$ 1,7*
DPP4	0,7 $\pm$ 0,4	5,2 $\pm$ 3,5
EMMPRIN	9,4 $\pm$ 4,8	4,6 $\pm$ 3,5
ENA-78	15,8 $\pm$ 17,6	11,3 $\pm$ 6,8
GDF-15	1,6 $\pm$ 08	12,1 $\pm$ 3,8*
GRO- $\alpha$	0,9 $\pm$ 1,3	15,6 $\pm$ 6,6*
HGF	-0,1 $\pm$ 1,5	20,4 $\pm$ 3,3*
IGFBP-2	-2,4 $\pm$ 1,4	12,1 $\pm$ 4,6*
Interferon- $\gamma$	6,3 $\pm$ 2,9	4,0 $\pm$ 3,4
Interleukin-8	20,2 $\pm$ 8,1	11,6 $\pm$ 6,3
Interleukin-17	9,4 $\pm$ 2,6	6,2 $\pm$ 3,3
MCP-1	2,3 $\pm$ 0,8	19,7 $\pm$ 2,2*
MIF	25,8 $\pm$ 8,6	15,5 $\pm$ 6,3
Pentraxin-2	6,6 $\pm$ 3,6	16,2 $\pm$ 7,1
SDF-1 $\alpha$	14,8 $\pm$ 13,9	13,9 $\pm$ 7,7
Serpin E1	33,1 $\pm$ 7,4	18,7 $\pm$ 3,4
Thrombospondin-1	24,0 $\pm$ 11,0	7,5 $\pm$ 4,8*
uPAR	11,3 $\pm$ 3,7	1,7 $\pm$ 1,1*
VCAM-1	-0,2 $\pm$ 0,7	7,9 $\pm$ 6,4*

Die Analyse erfolgte mittels *Proteome Profiler™ Cytokine Array* Kit. Dargestellt ist die jeweilige relative Lichtintensität [% x 750.000 Zellen<sup>-1</sup>] für Zytokine, die von undifferenzierten und 14 Tage hepatogen differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen gebildet wurden. Als Schwellenwert für die untere Nachweisgrenze wurde eine relative Lichtintensität von 5 % festgelegt.



Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SE); n = 4; \*p < 0,05

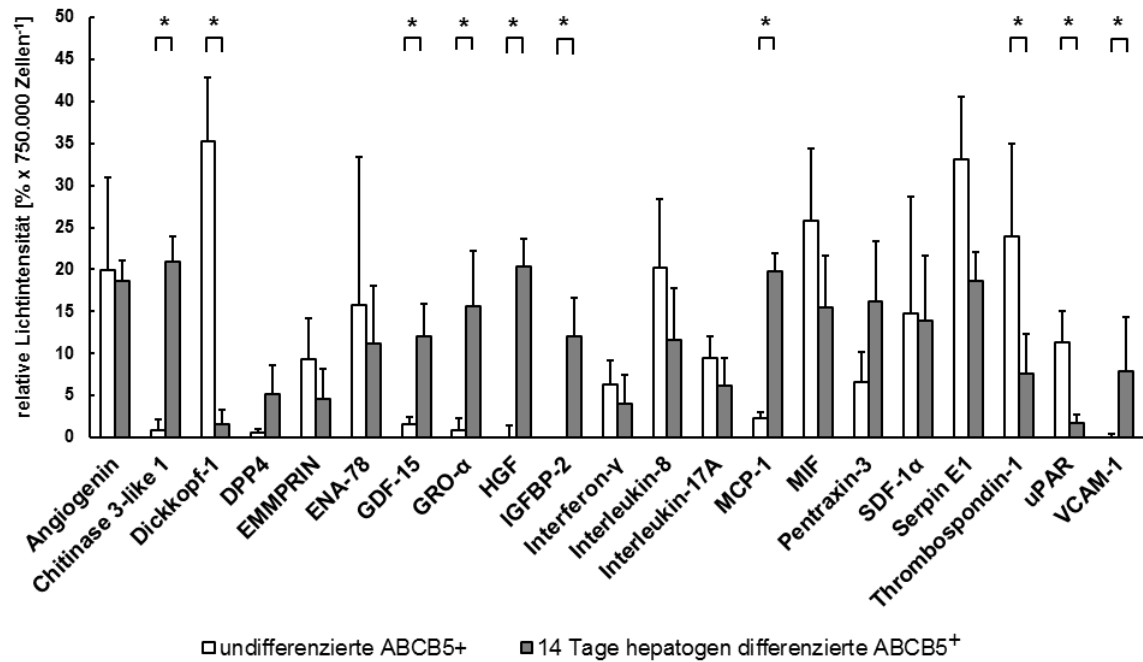


Abbildung 22: Grafische Darstellung der Sekretomanalyse von undifferenzierten und 14 Tage hepatogen differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen der menschlichen Haut. Die Analyse erfolgte mittels *Proteome Profiler™ Cytokine Array Kit*. Dargestellt ist die jeweilige relative Lichtintensität [% x 750.000 Zellen<sup>-1</sup>] für Zytokine, die von undifferenzierten (weiße Säulen) und 14 Tage hepatogen differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen (hellgraue Säule) gebildet wurden. Als Schwellenwert für die untere Nachweisgrenze wurde eine relative Lichtintensität von 5 % festgelegt. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SE); n = 4; \*p < 0,05

Die molekularen Interaktionen zwischen den sezernierten Zytokinen von undifferenzierten und 14 Tagen hepatogen differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen ist in Abbildung 23 dargestellt. Zu sehen ist ein ausgeprägtes Netzwerk, sowohl in undifferenzierten als auch differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen. In den differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen zeigte sich aufgrund der Zunahme an sezernierten Zytokinen eine erhöhte Anzahl an potentiellen Interaktionen (Abbildung 23 rechts). Auch die Analyse der KEGG Signalwege (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*; Version 10.0; <http://string-db.org/>) zeigte einen Unterschied zwischen den undifferenzierten und differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen (Anlage 3 und Anlage 4). Wenn auch mit einer geringen Signifikanz könnten sich demnach undifferenzierte ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen auf Signalwege des innate Immunsystems auswirken, wie z.B. Zytokin-Zytokin-Rezeptorinteraktionen (4060) oder die Komplement- und Koagulationskaskade (4610) (Anlage 3). Aber auch auf den TGF- $\beta$  Signalweg (4350), NF- $\kappa$ B Signalweg (4064) oder den HIF-1 Signalweg (4066). Nach der Differenzierung stieg die Signifikanz des NF- $\kappa$ B Signalwegs (4064) an und neue Signalwege des innate Immunsystems, wie z.B. TNF Signalweg (4668) und *NOD-like receptor* Signalweg (4621), sowie der das Zellwachstum betreffende p53 Signalweg (4115) kamen hinzu (Anlage 4).

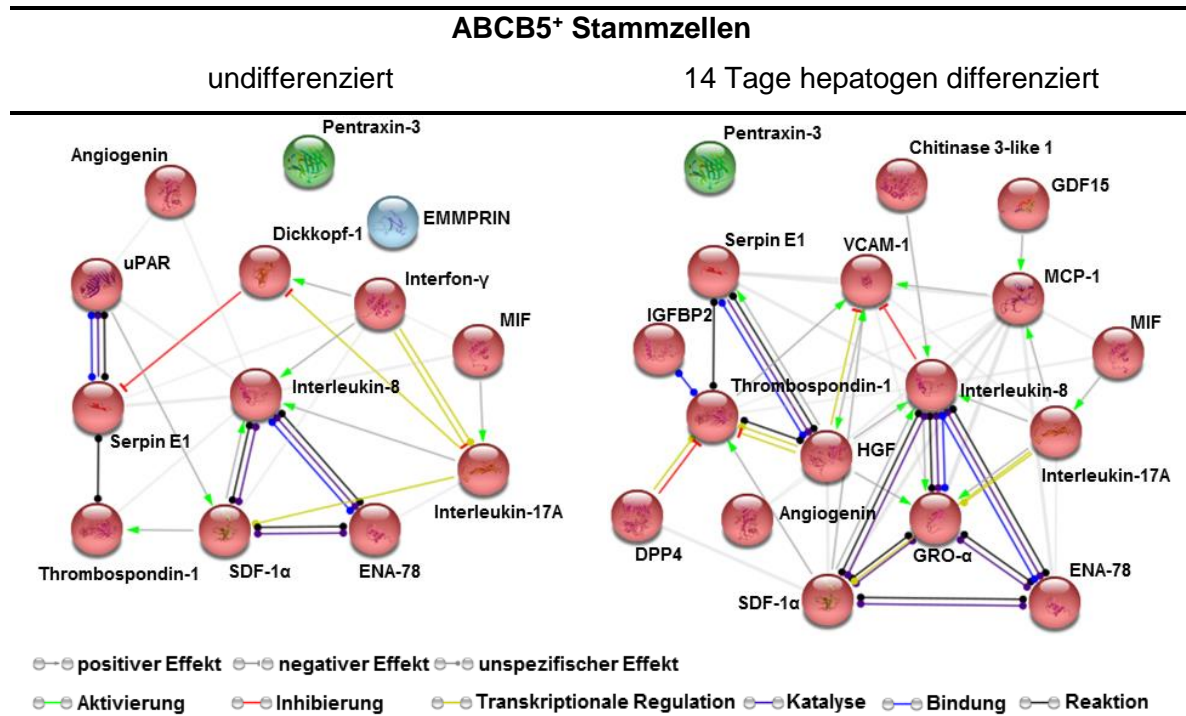


Abbildung 23: Netzwerk der molekularen Interaktionen ( $n = 4$ ) zwischen den sezernierten Zytokinen von undifferenzierten (links) und 14 Tage hepatogen differenzierten (rechts) ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen der menschlichen Haut.

Das Netzwerk wurde mittels der *STRING* Datenbank erstellt und zeigt die vorhergesagten molekularen Interaktionen der Zytokine (Version 10.0; <http://string-db.org/>).

Zusammenfassend lässt sich also sagen: Auch wenn kein signifikanter Hinweis auf die hepatozytäre Differenzierung der Stammzellen in Bezug auf die Expression leberspezifischer Gene oder die Zunahme spezifischer Stoffwechselleistungen gefunden wurde, so zeigten sich letztendlich dennoch quantitative und qualitative Unterschiede zwischen den undifferenzierten und 14 Tage hepatogen differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die verschiedenen Kultivierungsmedien Veränderungen der biologischen Eigenschaften der Zellen hervorgerufen haben. Inwieweit dies mit dem Gewinn hepatozytärer Funktionen oder der hepatotropen Wirkung der Stammzellen einhergeht, lässt sich augenscheinlich nicht einschätzen.

#### 4.3 Wirkung von undifferenzierten und differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen im xenogenen Transplantationsmodell

Mesenchymalen Stammzellen werden vielfältige Funktionen *in vivo* zugeschrieben. Dazu gehören insbesondere anti-inflammatorische und immunmodulatorische Eigenschaften, die im Hinblick auf akute und chronisch entzündliche Erkrankungen von besonderem therapeutischem Interesse sein könnten.

Allerdings haben einige Arbeiten auch gezeigt, dass MSC auch pro-tumorigene (Jia *et al.* 2016; Lindoso *et al.* 2015; Mathew *et al.* 2016; Yamada *et al.* 2016) oder profibrogene (Alison *et al.* 2009; Baertschiger *et al.* 2009; Di Bonzo *et al.* 2008) Eigenschaften haben könnten. Deshalb sollte hier untersucht werden, ob die ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen *in vivo* pathologische Veränderungen nach Transplantation in eine Empfängerleber induzierten. Um die Abstoßung der humanen Zelltransplantate zu verhindern, wurden immundefiziente Mäuse verwendet. Bei diesen wurde vor der Zellapplikation eine 30 %ige Hepatektomie durchgeführt. Diese stellt für die Restleber einen mitotischen Stimulus dar, der zur Regeneration der Leber führt (Fausto *et al.* 2006; Michalopoulos 2010). Es wurde angenommen, dass dieser Stimulus auch die Proliferation transplantiert-er ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen stimulieren und somit die „Re-Popularisierung“ der Empfängerleber durch transplantierte Zellen begünstigen könnte. Dies ist von therapeutischer Bedeutung, da angenommen wurde, dass ca. 1-5 % des Leberparenchyms durch transplantierte Hepatozyten ersetzt werden müssten, um z.B. einen monogenetischen Stoffwechseldefekt der Leber zu korrigieren (Bhatia *et al.* 2014).

### **4.3.1 Nachweis von undifferenzierten und differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen in der Empfängerleber**

Zunächst sollte untersucht werden, inwieweit transplantierte Stammzellen sich in der Empfängerleber ansiedelten. Zum Nachweis der transplantierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen wurde der humanspezifische Antikörper Ku80 in der Zellkultur auf seine Spezifität hin getestet. Der Ku80 Antikörper zeigte eine positive Färbung des im Zellkern lokalisierten Antigens, sowohl in den undifferenzierten als auch in den 14 Tage hepatogen differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen (Abbildung 24). Daher wurde dieser Antikörper für den Nachweis der Zellen in der Empfängerleber verwendet. Es konnte jedoch in der Leber weder 2 Tage noch 7 Wochen nach Transplantation der Zellen eine positive Ku80 Färbung und somit keine Zellen in der Leber nachgewiesen werden. Zum Nachweis, ob die Zellen möglicherweise in der Milz verblieben sind, da sie über den Milzpol appliziert worden, um mit dem Blutstrom in die Leber zu gelangen, wurde ebenfalls ein Nachweis des Ku80 in der Milz versucht.

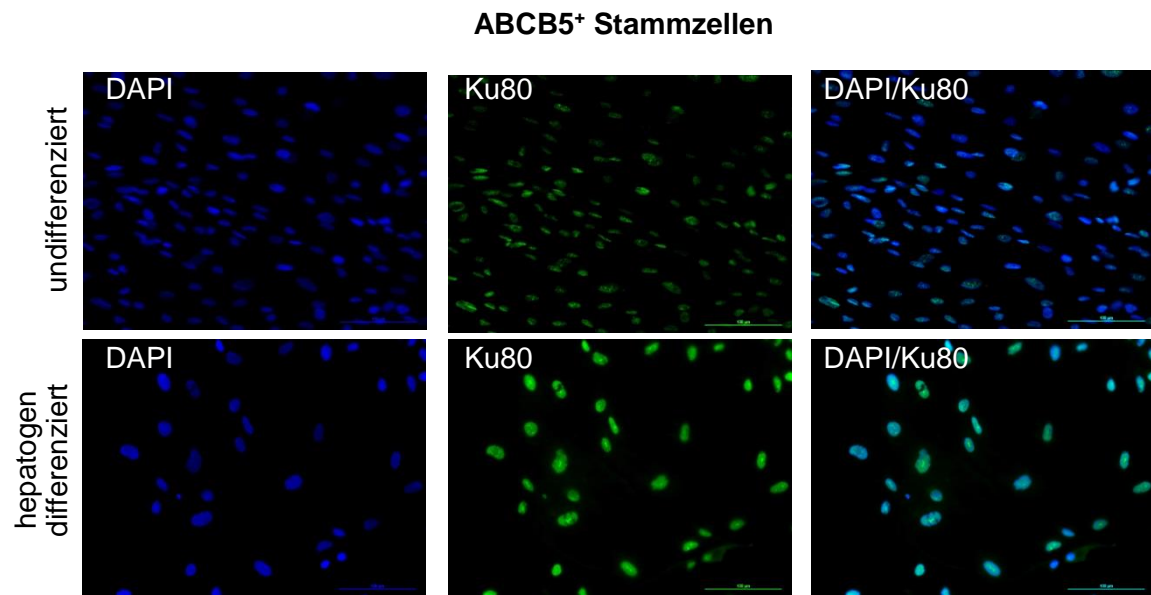


Abbildung 24: Nachweis von Ku80 in kultivierten undifferenzierten und 14 Tage hepatogen differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen. Gezeigt sind repräsentative Bildausschnitte. Die Zellen wurden von RHEACELL GmbH & Co. KG zur Verfügung gestellt. Skalierung: 100 µm

Auf Paraffinschnitten der Milz von Tieren, die undifferenzierte ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen erhielten, zeigte sich 2 Tage postoperativ eine positive Ku80-Färbung kleinerer Areale (Abbildung 25). In Tieren, die differenzierte ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen erhielten, konnte keine positive Färbung nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die Zellen nach der Applikation nicht oder nur in geringem Umfang in der Milz verblieben waren und mit dem Blut über die Milzvene in die Leber gelangt sein mussten. Der fehlende Nachweis der Zellen in der Leber lässt darauf schließen, dass es zu keiner Integration der Zellen in das Empfängergewebe gekommen ist. Stattdessen wurden die Zellen wahrscheinlich sehr bald nach Applikation über einen unbekannten Mechanismus eliminiert.

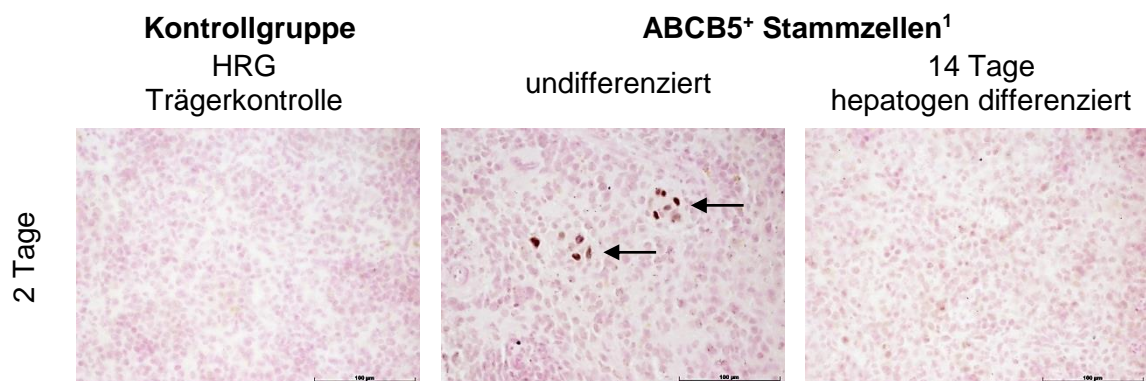


Abbildung 25: Nachweis von Ku80 in Gewebeschnitten der Milz (n = 3) von Pfp/Rag2<sup>-/-</sup> Mäusen 2 Tage nach der Transplantation von undifferenzierten und 14 Tagen hepatogen differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen.

Die Zellen wurden injektionsfertig in einer Spritze von RHEACELL GmbH & Co. KG zur Verfügung gestellt. Als Trägerlösung diente HRG (HRG, 5 %iges humanes Serumalbumin (49,5 Vol.-%); Ringer-Laktat (49,5 Vol.-%); 4 %ige Glucose (1 Vol.-%)). Skalierung: 100 µm

#### **4.3.2 Die transplantierten Stammzellen verursachten keine offensichtliche Leberschädigung**

Um eine mögliche Leberschädigung durch die Applikation der undifferenzierten und differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen auszuschließen, wurden Körper- und Organgewichte bestimmt, die als Surrogatparameter für den Allgemeinzustand der Tiere nach Zelltransplantation dienten. Weiterhin wurden die Triglyceride im Serum bestimmt, um Hinweise auf eine mögliche Störung des hepatischen Lipidstoffwechsels zu erhalten, wie in früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe nach umfangreicher Leberresektion nachgewiesen worden war (Tautenhahn *et al.* 2016).

Die Organentnahme erfolgte 2 Tage bzw. 7 Wochen nach der Transplantation der undifferenzierten und differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen sowie der Trägerkontrolle HRG nach einer 30 %igen Hepatektomie. In Abbildung 26 sind die Körpergewichte bzw. die Gewichte von Leber, Milz, Niere, Lunge und Herz dargestellt.

Alle Versuchstiere wurden vor Versuchsbeginn (Abbildung 26 – präoperative) und erneut vor Organentnahme am Tag 2 oder 7 Wochen nach der Zellapplikation (Abbildung 26 – postoperativ) gewogen. Erwartungsgemäß zeigten sich hier in den Kontrollgruppen und in den Gruppen, die undifferenzierte ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen erhalten sollten, präoperativ keine Gewichtsunterschiede. Lediglich die Tiere der Gruppe, die differenzierte ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen für 7 Wochen erhalten sollte, waren geringfügig, jedoch signifikant leichter als die Tiere, die die Stammzellen nur für 2 Tage erhalten sollten. Dieser Unterschied schlug sich auch in der Entwicklung des Körpergewichts nach erfolgter Zellapplikation nieder.

Während alle Tiere in den Kontrollgruppen und in den Gruppen, die undifferenzierte ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen erhielten, eine altersgemäße signifikante Zunahme des Körpergewichts nach 7 Wochen im Vergleich zu 2 Tagen aufwiesen, war dieser Unterschied in den Gruppen mit differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen nicht zu beobachten. Um unterscheiden zu können, ob eventuelle Unterschiede auf die Behandlung mit Stammzellen oder lediglich auf unterschiedliche Ausgangskörpergewichte zurückzuführen waren, wurden neben dem absoluten Körpergewicht auch die Verhältnisse von Organgewicht in Bezug auf das Körpergewicht berechnet (Abbildung 27). Hier zeigte sich in allen Gruppen eine signifikante Steigerung des Leber-Körpergewichtverhältnisses nach 7 Wochen im Vergleich zu 2 Tagen postoperativ. Diese Steigerung war in allen Gruppen gleich und war auf die Zunahme des Lebergewichts nach der 30 %igen Hepatektomie zurückzuführen.

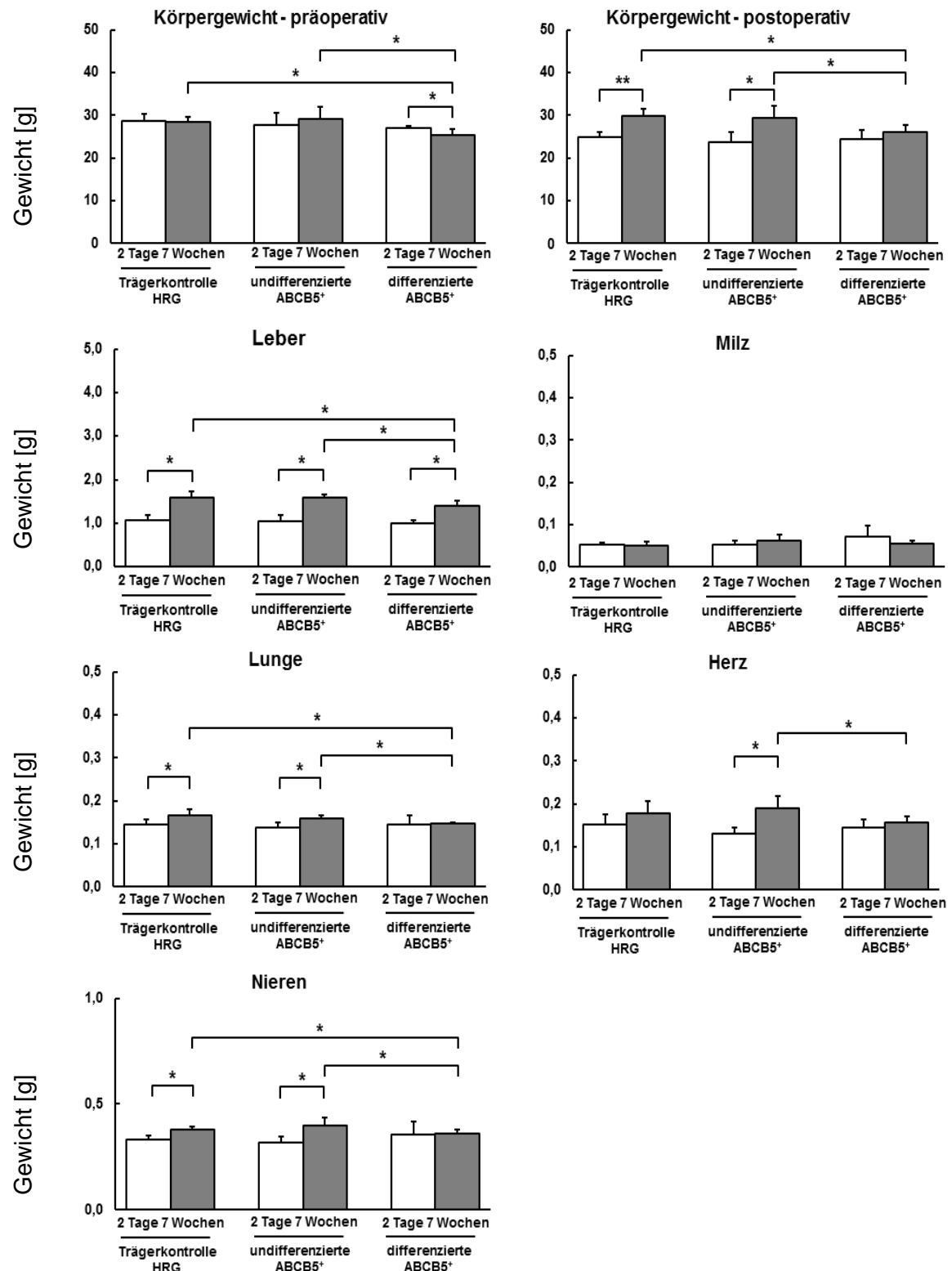


Abbildung 26: Körper- und Organgewichte von Pfp/Rag2<sup>-/-</sup> Mäusen 2 Tage und 7 Wochen nach der Transplantation von undifferenzierten und 14 Tagen hepatogen differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen.

Dargestellt sind die jeweiligen Gewichte [g] zum Zeitpunkt 2 Tage (weiße Säulen) und 7 Wochen (hellgraue Säulen). Mittelwerte ± Standardabweichung (SE); n ≥ 5; \*p < 0,05; \*\* p < 0,005

Die Unterschiede, die innerhalb der Gruppen im Organgewicht zwischen 2 Tagen und 7 Wochen beobachtet wurden (Abbildung 26), waren ebenfalls lediglich der altersgemäßen Gewichtszunahme zuzurechnen. Die Berechnung der Organ-Körpergewichtsverhältnisse wies im Wesentlichen keine Unterschiede auf. Weder zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen noch zwischen den Altersgruppen (Abbildung 26).

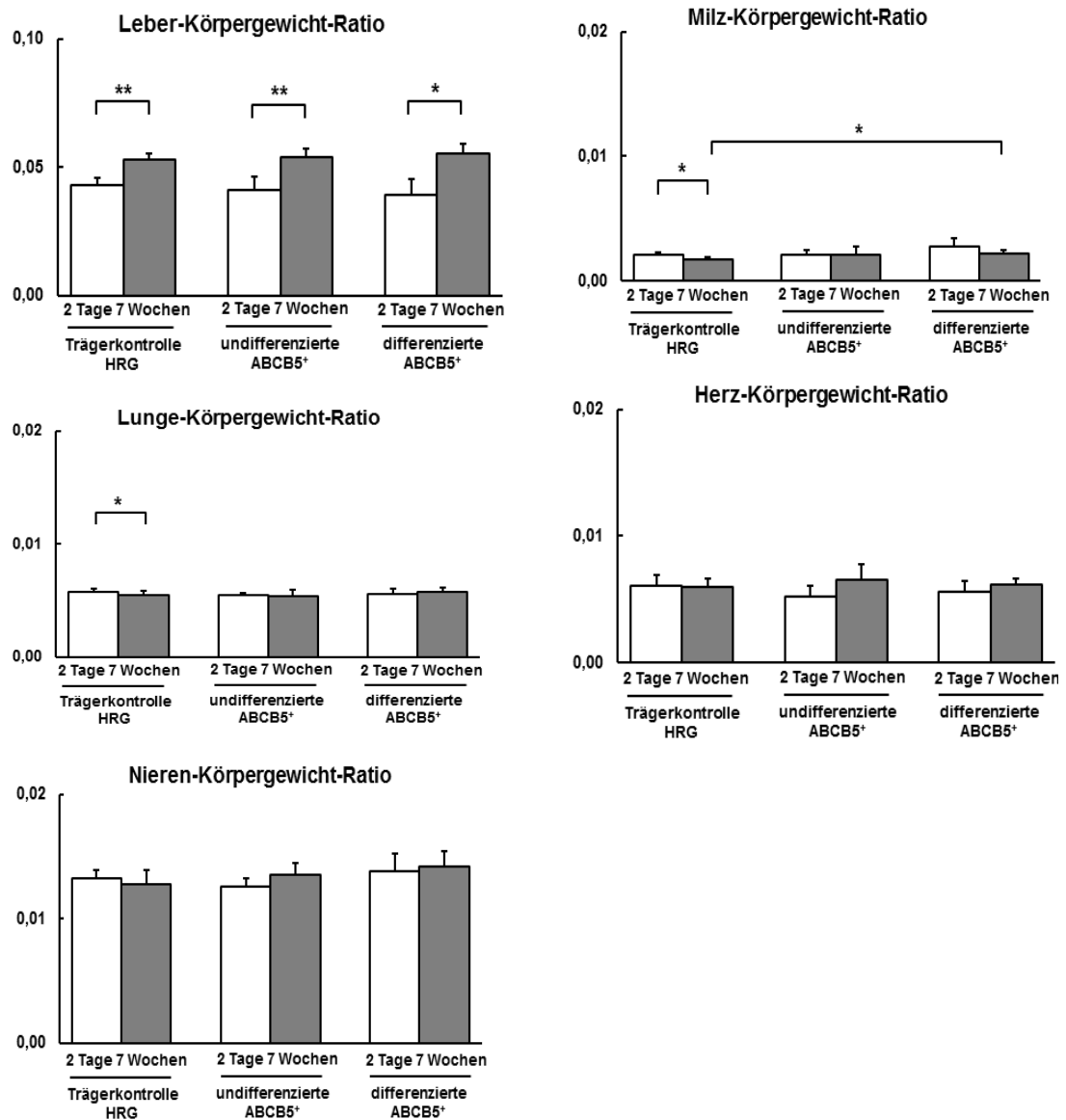


Abbildung 27: Verhältnisse von Organ-zu-Körpergewichten von Pfp/Rag2<sup>-/-</sup> Mäusen 2 Tage und 7 Wochen nach der Transplantation von undifferenzierten und 14 Tagen hepatogen differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen. Dargestellt sind die jeweiligen Verhältnisse von Organ-zu-Körpergewichten zum Zeitpunkt 2 Tage (weiße Säulen) und 7 Wochen (hellgraue Säulen). Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SE);  $n \geq 5$ ; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$

Insgesamt kann man davon ausgehen, dass die Zellapplikation keinen Einfluss auf die altersabhängige Gewichtszunahme hatte und somit von einem guten Allgemeinzustand der Tiere in den Kontrollgruppen und in den Behandlungsgruppen auszugehen war. Weiterhin hatte die Zellapplikation offensichtlich keinen Einfluss auf die Entwicklung der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie, wie der Vergleich der Leber-Körpergewichtsverhältnisse in den Kontroll- und Behandlungsgruppen zeigte.

Auch die Analyse der Triglyceride zeigte keine Auffälligkeiten. In der Kontrollgruppe waren die Triglyceride zum Zeitpunkt 7 Wochen im Vergleich zu 2 Tagen signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ) (Abbildung 28). Tiere, die undifferenzierte ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen erhielten, zeigten zum Zeitpunkt 2 Tage signifikant höhere Triglyceridwerte im Vergleich zur Kontrollgruppe und zu Tieren die 14 Tage hepatogen differenzierte ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen erhielten. Der höchste Triglyceridwert mit  $1,15 \pm 0,67 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$  zeigte sich in der Kontrollgruppe 7 Wochen postoperativ. Da man davon ausgehen muss, dass dieser Wert einer physiologischen, altersabhängigen Zunahme entspricht, lässt sich folgern, dass die ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen diese Zunahme verhinderten. Dies wiederum könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Stammzellen den hepatischen Lipidmetabolismus beeinflussten. Daher wurde dieser Befund weiter untersucht (s. 4.3.3).

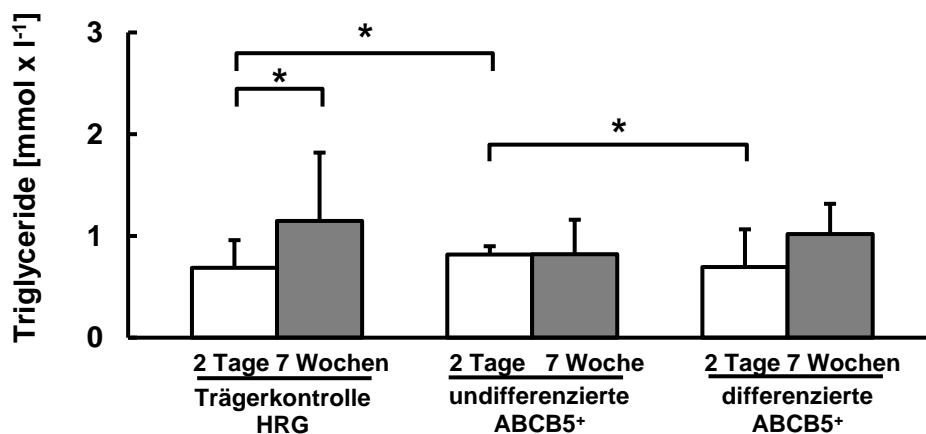


Abbildung 28: Triglyceride im Serum von Pfprag2<sup>-/-</sup> Mäusen 2 Tage und 7 Wochen nach der Transplantation von undifferenzierten und 14 Tagen hepatogen differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen.

Dargestellt sind die Triglyceridspiegel [mmol x l<sup>-1</sup>] zum Zeitpunkt 2 Tage (weiße Säulen) und 7 Wochen (hellgraue Säulen). Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SE);  $n \geq 5$ ; \*  $p < 0,05$



Um auszuschließen, dass die Transplantation der ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen histologische Veränderungen in der Leber verursachten, wurde zunächst eine Übersichtsfärbung mittels Hämalaun-Eosin angefertigt. Bei der mikroskopischen Analyse der Paraffinschnitte der Lebern gab es keine Auffälligkeiten, wie z.B. Zelluntergang oder Tumore. Allerdings waren in den Lebern der Tiere, die ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen erhalten hatten, vermehrt Lipideinlagerungen zu beobachten (Abbildung 29). Dies deutet erneut auf einen metabolischen Einfluss der Stammzelltransplantation hin.

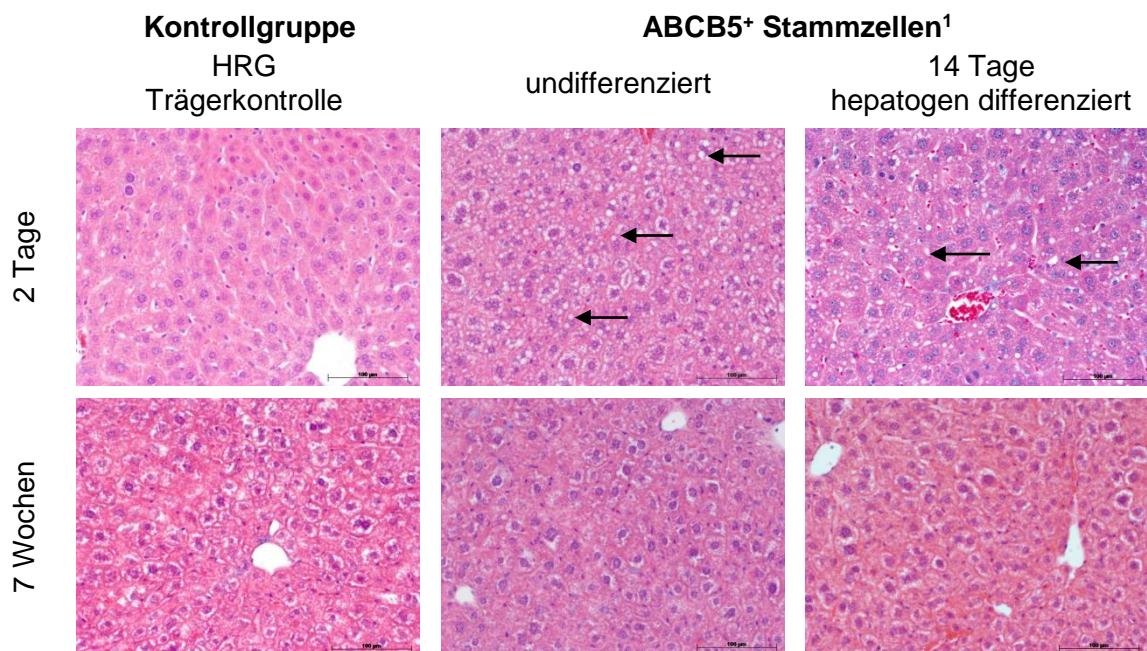


Abbildung 29: Repräsentative Bildausschnitte der Leber ( $n \geq 5$ ) von Pfp/Rag2<sup>-/-</sup> Mäusen 2 Tage und 7 Wochen nach der Transplantation von undifferenzierten und 14 Tagen hepatogen differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen nach Hämalaun-Eosin Färbung. Als Trägerlösung diente HRG (HRG, 5 %iges humanes Serumalbumin (49,5 Vol.-%); Ringer-Laktat (49,5 Vol.-%); 4 %ige Glucose (1 Vol.-%)). Die Pfeile deuten auf Lipideinlagerungen hin. Skalierung: 100 µm

Als Marker für die Leberzellschädigung wurden die Enzymaktivitäten der Aspartat-Aminotransferase (AST) sowie der Alanin-Aminotransferase (ALT) im Serum analysiert (Abbildung 30). In den Kontroll- und den Behandlungsgruppen waren die Enzymaktivitäten zum Zeitpunkt 2 Tage gegenüber 7 Wochen nach Zellapplikation erhöht. Dies war wahrscheinlich auf die Teilresektion der Leber zurückzuführen, die sich nach 7 Wochen wieder erholt hatte. Die höchste Enzymaktivität mit  $5,5 \pm 4,92 \mu\text{kat} \times \text{l}^{-1}$  für AST und  $4,26 \pm 1,87 \mu\text{kat} \times \text{l}^{-1}$  für ALT zeigte sich in den mit undifferenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen behandelten Tieren, 2 Tage postoperativ. Dieser Wert lag signifikant über dem der Kontrollgruppe und könnte darauf hinweisen, dass die undifferenzierten Zellen einen zur eigentlichen Leberresektion zusätzlichen Schaden verursachen.

Dieser war jedoch transient, da 7 Wochen nach Zellapplikation keine signifikanten Unterschiede mehr zu beobachten waren. Die Enzymaktivität von  $\gamma$ -Glutamyl-Transferase ( $\gamma$ -GT), die ein Maß für die Schädigung der Gallengänge darstellt, lag unterhalb der Nachweisgrenze von  $< 0,05 \mu\text{kat} \times \text{l}^{-1}$ . Somit verursachte die Applikation von ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen keinen ausgeprägten Leberschaden.

Insgesamt betrachtet zeigten sich anhand der untersuchten Parameter im Beobachtungszeitraum keine Nekrosen, Tumore oder anderweitige Leberschädigungen.

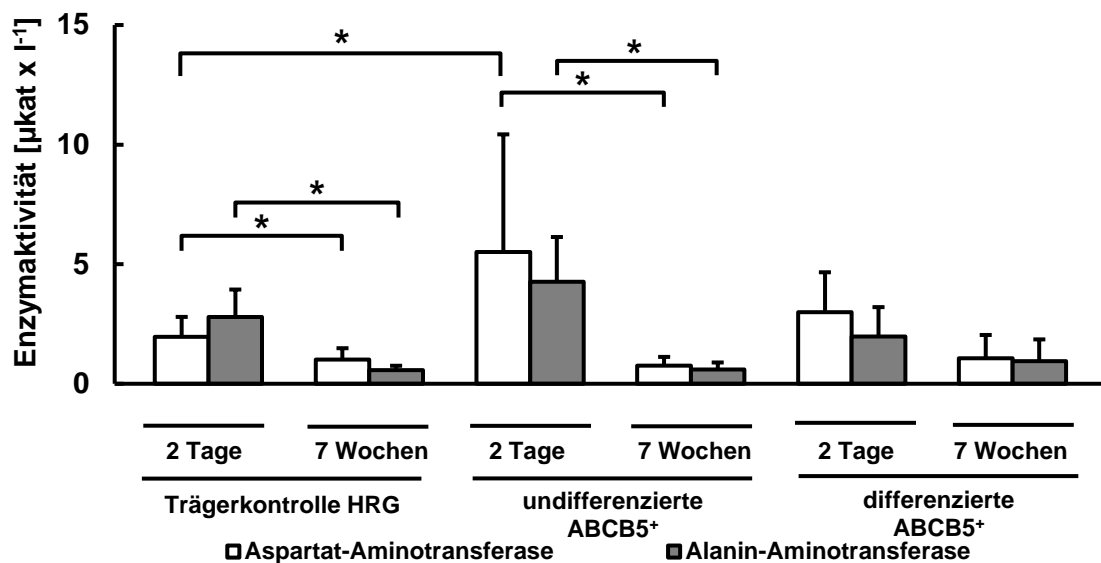


Abbildung 30: Enzymaktivitäten der Aspartat-Aminotransferase sowie der Alanin-Aminotransferase im Serum von Pfp/Rag2<sup>-/-</sup> Mäusen 2 Tage und 7 Wochen nach der Transplantation von undifferenzierten und 14 Tagen hepatogen differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen.

Dargestellt sind die jeweiligen Enzymaktivitäten [ $\mu\text{kat} \times \text{l}^{-1}$ ] zum Zeitpunkt 2 Tage (weiße Säulen) und 7 Wochen (hellgraue Säulen). Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SE);  $n \geq 5$ ; \*  $p < 0,05$

#### 4.3.3 Einfluss der ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen auf den Leberstoffwechsel

Die beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass die Transplantation der undifferenzierten und differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen nach der 30 %igen Hepatektomie keine signifikanten Auswirkungen auf den Gesundheitsstatus der Mäuse oder eine über die Leberresektion hinaus gehende Schädigung der Leber hatten. Allerdings schien der hepatische Lipidstoffwechsel betroffen, so dass hier weitergehende Untersuchungen durchgeführt wurden.

Es ist bekannt, dass nach einer partiellen Hepatektomie eine temporäre Hepatosteatosis zu beobachten ist. Diese ist wahrscheinlich auf eine durch den Operationsstress bedingte gesteigerte Lipolyse im Fettgewebe und eine vermehrte hepatische Aufnahme der Fettsäuren und ihre Speicherung in der Leber zurückzuführen, wo sie dann den erhöhten Energiebedarf der regenerierenden Leber decken (Christ *et al.* 2015; Farrell 2004; Fausto 2004; Huang & Rudnick 2014; Walldorf *et al.* 2010). Während diese „physiologische“ Leberverfettung notwendig ist, führt eine vermehrte Fetteinlagerung, wie sie z.B. nach Leberresektionen von bis zu 70 % beobachtet wird, zum Tod der Hepatozyten und zur Hemmung der Leberregeneration (Hamano *et al.* 2014; Shteyer *et al.* 2004; Tautenhahn *et al.* 2016).

Hier sollte zunächst geklärt werden, inwieweit es sich bei den in der Übersichtsfärbung (Abbildung 29) beobachteten Einlagerungen tatsächlich um Lipide handelte. Der Nachweis der Lipide erfolgte mittels Sudan III-Färbung am Gefrierschnitt. Repräsentative Bildausschnitte sind in Abbildung 31 A zu sehen. Die semiquantitativ bestimmte prozentuale Lipidakkumulation der einzelnen Behandlungsgruppen ist in Abbildung 31 B zusammengefasst. 7 Wochen nach der Operation war die Lipideinlagerung in den Lebern sowohl der mit undifferenzierten (exakter Mann-Whitney-U Test:  $U = 2,000$ ,  $p < 0,05$ ) als auch hepatogen differenzierten Stammzellen (exakter Mann-Whitney-U Test:  $U = 0,000$ ,  $p < 0,005$ ) behandelten Tiere im Vergleich zu 2 Tagen signifikant zurückgegangen. Die höchste Lipidakkumulation in der Leber mit  $13,5 \% \pm 8,9 \%$  zeigte sich in der mit undifferenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen behandelten Gruppe 2 Tage nach Zellapplikation. Diese war zwar nicht signifikant, aber doch sichtbar höher als in den Kontrollgruppen oder den mit differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen behandelten Tieren. Diese Daten zeigen, dass die beobachteten Lipideinlagerungen transient waren, in den mit undifferenzierten Stammzellen behandelten Tieren aber deutlich höher ausfielen als in den anderen Gruppen (Abbildung 31 B).

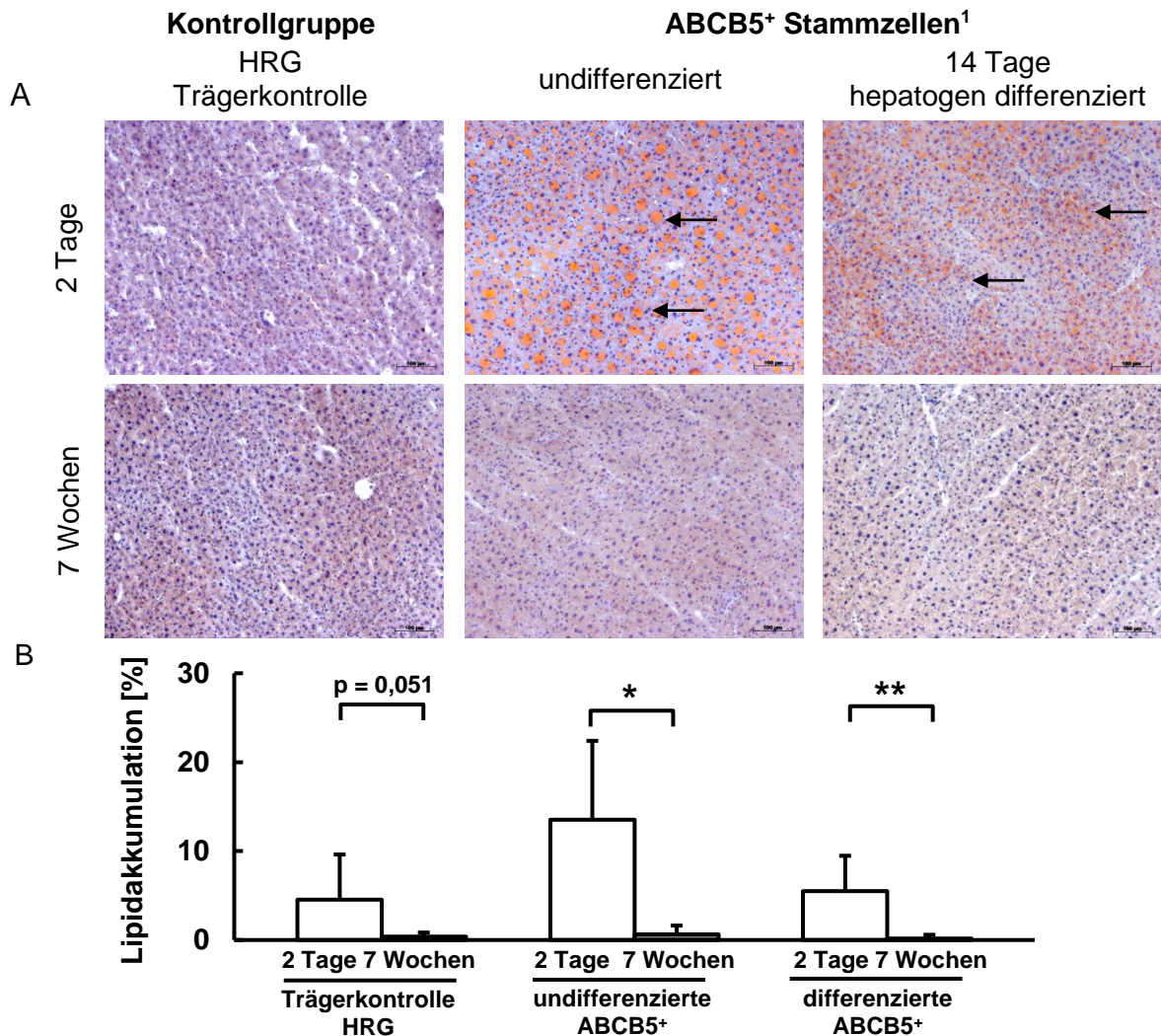


Abbildung 31: Repräsentative Bildausschnitte der Lebern (n = 4) (A) und Lipidakkumulation (B) von Pfp/Rag2<sup>-/-</sup> Mäusen 2 Tage und 7 Wochen nach der Transplantation von undifferenzierten und 14 Tagen hepatogen differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen nach Sudan III Färbung.

<sup>1</sup>adulte Stammzellen der menschlichen Haut (RHEACELL GmbH & Co. KG)

HRG, 5 %iges humanes Serumalbumin (49,5 Vol.-%); Ringer-Laktat (49,5 Vol.-%); 4 %ige Glucose (1 Vol.-%); Lipideinlagerung (Pfeile, orange); Skalierung: 100 µm

Mittelwerte ± Standardabweichung (SE); n = 4; \* p < 0,05

Um Hinweise auf einen möglichen Mechanismus der Stammzellwirkung auf den Lipidstoffwechsel zu erhalten, wurde die Beeinflussung von zentralen Genen des Lipidstoffwechsels auf RNA-Ebene untersucht. Es wurden die beiden Fettsäuretransporter CD36 und FABP1, sowie die regulatorischen Transkriptionsfaktoren der Fettsäureverwertung und der *de novo* Lipogenese, PPARα und SREBP 1C mittels semi-quantitativer RT-PCR, 2 Tage und 7 Wochen nach der Transplantation von undifferenzierten und 14 Tage hepatogen differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen untersucht. Zur Normalisierung der Ergebnisse wurden die Haushaltsgene B2M und TATA verwendet. Abbildung 32 zeigt die PCR-Produkte repräsentativer PCR-Läufe (n = 4). Die semi-quantitative Auswertung mit der Angabe signifikanter Unterschiede ist grafisch in Abbildung 39 dargestellt.

	Kontrollgruppe		ABCB5 <sup>+</sup> Stammzellen			
	HRG Trägerkontrolle		undifferenziert		hepatogen differenziert	
CD 36						
FABP1						
PPARα						
SREBP 1C						
B2M						
TATA						
Zeitpunkt	2 Tage 7 Wochen		2 Tage 7 Wochen		2 Tage 7 Wochen	

Abbildung 32: Dokumentation der PCR-Produkte von repräsentativen Proben ( $n = 4$ ) zum Nachweis der Expression von Stoffwechselgenen in Lebergewebe von Pfp/Rag2<sup>-/-</sup> Mäusen 2 Tage und 7 Wochen nach der Transplantation von undifferenzierten und 14 Tage hepatogen differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen.

B2M,  $\beta$ 2-Mikroglobulin; CD36, *cluster of differentiation 36*; FABP1, *fatty acid-binding protein 1*; HRG, 5 %iges humanes Serumalbumin (49,5 Vol.-%), Ringer-Laktat (49,5 Vol.-%), 4 %ige Glucose (1 Vol.-%); PPAR $\alpha$ , *peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$* ; SREBP 1C, *sterol regulatory element-binding transcription factor 1C*

Der Fettsäuretransporter CD36 war außer in Tieren, die hepatogen differenzierte ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen erhalten hatten, zum Zeitpunkt 7 Wochen postoperativ nicht differentiell exprimiert. Die Expression des FABP1 (*fatty acid binding protein 1*), ein weiterer Fettsäuretransporter, war in Kontrolltieren 2 Tage postoperativ signifikant höher als in den anderen Gruppen ( $p < 0,05$ ; Abbildung 39). Die Expression von FABP1 war ebenfalls 7 Wochen postoperativ in der Kontrollgruppe höher als in Tieren, die hepatogen differenzierte ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen erhielten ( $p < 0,05$ ; Abbildung 39). PPAR $\alpha$  war in Kontrolltieren 2 Tage postoperativ signifikant höher exprimiert als in Tieren, die undifferenzierte ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen erhielten ( $p < 0,05$ ; Abbildung 39). 7 Wochen postoperativ, exprimierte die Kontrollgruppe signifikant mehr PPAR $\alpha$  als Tiere, die undifferenzierte und hepatogen differenzierte ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen erhielten ( $p < 0,05$ ; Abbildung 39). Ebenfalls war die Expression von PPAR $\alpha$  in Tieren, die hepatogen differenzierte ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen erhielten, signifikant niedriger als in Tieren mit undifferenzierte ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen ( $p < 0,05$ ; Abbildung 39). Von 2 Tagen zu 7 Wochen postoperativ war PPAR $\alpha$  in Tieren, die hepatogen differenzierte ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen erhielten, außerdem signifikant gesunken ( $p < 0,05$ ; Abbildung 39).

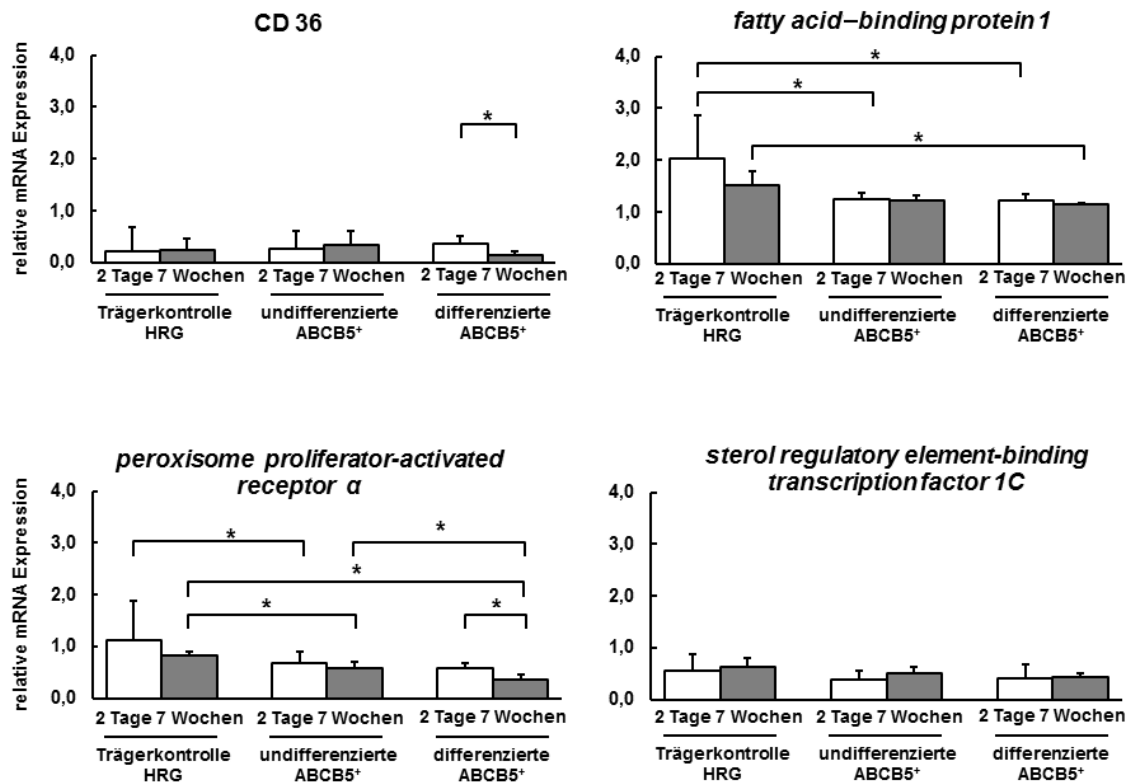


Abbildung 33: Relative mRNA Expression von Schlüsselgenen des Lipidmetabolismus im Lebergewebe von Pfp/Rag2<sup>-/-</sup> Mäusen 2 Tage und 7 Wochen nach der Transplantation von undifferenzierten und 14 Tagen hepatogen differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen. Die Analyse erfolgte mittels RT-PCR. Dargestellt sind Expressionsprofile zum Zeitpunkt 2 Tage (weiße Säulen) und 7 Wochen (hellgraue Säulen). Zur Normalisierung wurden die Haushaltsgene B2M und TATA verwendet. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SE); n = 4; \* p < 0,05

Der Transkriptionsfaktor SREBP 1C (*sterol regulatory element-binding transcriptionfactor 1C*) zeigte keine signifikanten Änderungen (Abbildung 39). Da FABP1 und PPAR $\alpha$  also tendenziell in den Kontrolllebern höher exprimiert wurde als in den mit Stammzellen behandelten Tieren kann man folgern, dass in Kontrolltieren die Fettsäureaufnahme und -verwertung gegenüber den mit Stammzellen behandelten Tieren erhöht war. Gleichzeitig schien es keine Unterschiede in der Expression von SREBP 1C und somit auch nicht in der *de novo* Lipogenese zu geben. Daher muss man davon ausgehen, dass die Applikation der Stammzellen eine Verminderung der Verwertung von Fettsäuren bewirkte. Dies könnte zu der verstärkten Lipideinlagerung gegenüber der Kontrollgruppe beigetragen haben (Abbildung 31).



#### 4.3.4 Die transplantierten Stammzellen zeigten keine pro-fibrotische Wirkung auf das Lebergewebe

Die exzessive Einlagerung von Kollagen und anderen Komponenten der extrazellulären Matrix führt in der Leber zur Fibrose. Sie spiegelt ein gestörtes Gleichgewicht zwischen Matrixproduktion und -abbau wieder (Friedman 2008; Giannandrea & Parks 2014). Da MSC sowohl anti-fibrotische als auch pro-fibrotische Wirkungen haben können, wurden in der vorliegenden Studie auch Fibrosemarker und der Kollagengehalt der Leber mittels RT-PCR (Abbildung 34, Abbildung 34) und Sirius Red-Färbung (Abbildung 34) untersucht (Alison *et al.* 2009; Kim *et al.* 2014).

TIMP1 (*tissue inhibitor of metalloproteinases 1*), ein Inhibitor der Metalloproteinasen, dessen Veränderungen in der Expression Matrixumbau anzeigt (Brew *et al.* 2000), war zum Zeitpunkt 2 Tage nach Zelltransplantation in der Kontrollgruppe und in Tieren, die differenzierte ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen erhielten, signifikant höher im Vergleich zu 7 Wochen ( $p < 0,05$ ; Abbildung 39) nach Zelltransplantation. VEGF (*vascular endothelial growth factor*), ein die Angiogenese stimulierender Wachstumsfaktor, der in der Pathogenese der Fibrose ebenfalls eine Rolle spielt (Roth & Copple 2015), war in Tieren, die undifferenzierte und hepatogen differenzierte ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen erhielten, zum Zeitpunkt 2 Tage und 7 Wochen signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ; Abbildung 39).

	Kontrollgruppe		ABCB5 <sup>+</sup> Stammzellen			
	HRG Trägerkontrolle		undifferenziert		hepatogen differenziert	
TIMP1						
VEGF						
B2M						
TATA						
Zeitpunkt	2 Tage 7 Wochen		2 Tage 7 Wochen		2 Tage 7 Wochen	

Abbildung 34: Dokumentation der PCR-Produkte von repräsentativen Proben ( $n = 4$ ) zum Nachweis von Fibrosemarkern in Lebergewebe von Pfp/Rag2<sup>-/-</sup> Mäusen 2 Tage und 7 Wochen nach der Transplantation von undifferenzierten und 14 Tage hepatogen differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen.

B2M,  $\beta$ 2-Mikroglobulin; HRG, 5 %iges humanes Serumalbumin (49,5 Vol.-%), Ringer-Laktat (49,5 Vol.-%), 4 %ige Glucose (1 Vol.-%); TIMP1, *tissue inhibitor of metalloproteinases 1*; VEGF, *vascular endothelial growth factor*

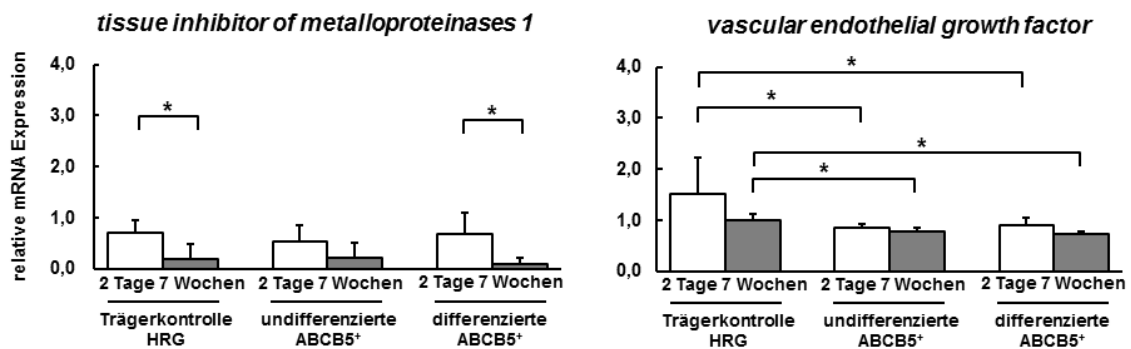


Abbildung 35: Relative mRNA Expression von Markern der Angiogenese in Lebergewebe von Pfp/Rag2<sup>-/-</sup> Mäusen 2 Tage und 7 Wochen nach der Transplantation von undifferenzierten und 14 Tagen hepatogen differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen. Die Analyse erfolgte mittels RT-PCR. Dargestellt sind Expressionsprofile zum Zeitpunkt 2 Tage (weiße Säulen) und 7 Wochen (hellgraue Säulen). Zur Normalisierung wurden die Haushaltsgene B2M und TATA verwendet. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SE); n = 4; \* p < 0,05

Der Nachweis kollagener Fasern mittels Sirius Red-Färbung ergab keine auffälligen Veränderungen in mit Stammzellen behandelten Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren (Abbildung 34). Da also weder die Expression von Fibrosemarkern noch der histochemische Nachweis von Kollagen nachhaltige Veränderungen in mit Stammzellen behandelten Tieren ergab, kann man schlussfolgern, dass die undifferenzierten und differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen keine pro-fibrogene Wirkung zeigten.

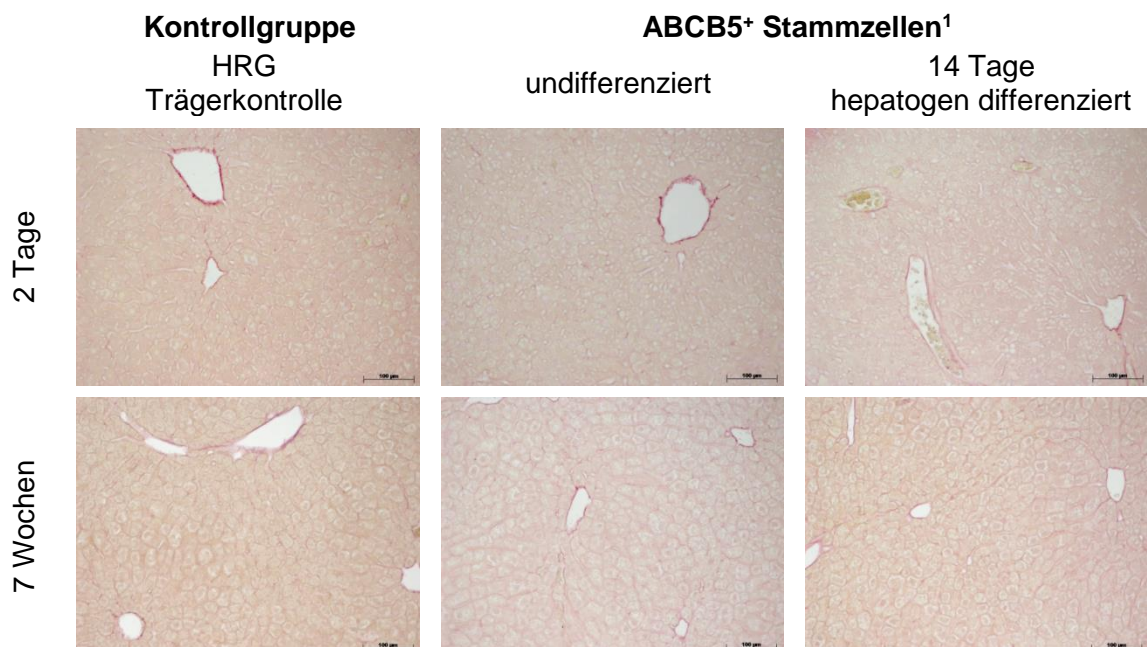


Abbildung 36: Nachweis kollagener Fasern.

Gezeigt werden repräsentative Bildausschnitte (n = 2) der Lebern von Pfp/Rag2<sup>-/-</sup> Mäusen 2 Tage und 7 Wochen nach der Transplantation von undifferenzierten und 14 Tagen hepatogen differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen nach Sirius Red-Färbung, die kollagene Fasern (rot) sichtbar macht.

HRG, 5 %iges humanes Serumalbumin (49,5 Vol.-%); Ringer-Laktat (49,5 Vol.-%); 4 %ige Glucose (1 Vol.-%); Skalierung: 100 µm



#### **4.3.5 Die transplantierten Stammzellen zeigten keine pro-proliferative Wirkung auf das Lebergewebe**

Durch Zell-Zell-Kontakt und die Sezernierung von parakrinen Substanzen können MSC u.a. pro-proliferativ wirken (Christ *et al.* 2015; Nicolas *et al.* 2016; Prockop & Youn Oh 2012; Squillaro *et al.* 2016). Die extensive Expansion *in vitro*, die Kultivierung in Gegenwart von Wachstumsfaktoren oder das Passagieren der Zellen können auch das Risiko von genetischen Mutationen erhöhen (Meier *et al.* 2013). Um eine mögliche pro-proliferative oder pro-tumorigene Wirkung der ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen auszuschließen, wurde die Proliferationsrate in der Leber mittels des Proliferationsmarkers Ki67 analysiert. In Abbildung 37 A sind repräsentative Bildausschnitte der Ki67-Färbung in der Leber dargestellt. Zu sehen ist eine starke Proliferation 2 Tage postoperativ, die unabhängig davon war, ob die Tiere transplantierte Stammzellen erhalten hatten oder nicht (Pfeile Abbildung 37). Die quantitative Auswertung ergab, dass die Proliferationsrate in allen Gruppen 2 Tage nach der Transplantation der Stammzellen signifikant höher gegenüber den Werten nach 7 Wochen war (Abbildung 37 B). Dies ist auf die Stimulation der Proliferation durch die partielle Hepatektomie zurückzuführen. Da die ursprüngliche Größe der Leber vor der Hepatektomie nach ca. 7 Tagen wieder erreicht wurde, ist zu späteren Zeitpunkten keine erhöhte Proliferationsrate messbar.

Berechnet man die Korrelation zwischen der Lipidakkumulation (Abbildung 37) und der hier bestimmten Proliferationsrate 2 Tage und 7 Wochen postoperativ in Tieren, denen undifferenzierte ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen appliziert wurden, zeigte sich eine positive Korrelation ( $r = 0,399$ ;  $p = 0,011$ ). Dies bedeutet, dass die erhöhte Lipideinlagerung mit einer erhöhten Proliferationsrate einherging und untermauert die Annahme, dass die nach partieller Hepatektomie beobachtete Lipidakkumulation der Bereitstellung von Energiesubstraten für die erhöhte mitotische Aktivität dienen könnte.

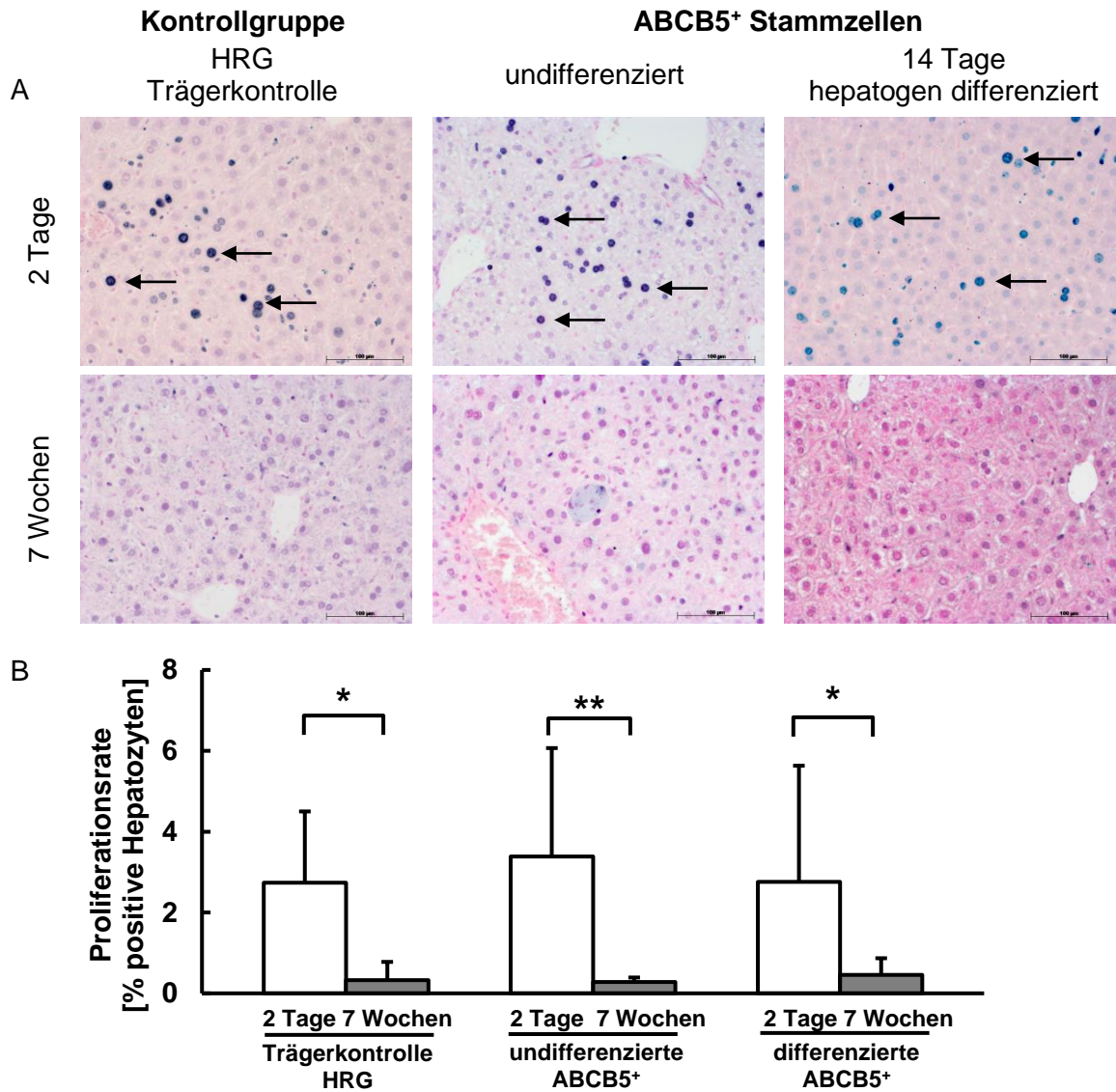


Abbildung 37: Nachweis des Proliferationsmarkers Ki67.

Gezeigt werden repräsentative Bildausschnitte ( $n \geq 5$ ) der Lebern (A) von Pfp/Rag2<sup>-/-</sup> Mäusen 2 Tage und 7 Wochen nach der Transplantation von undifferenzierten und 14 Tagen hepatogen differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen. In (B) wurde die Proliferationsrate quantitativ durch Auszählung der Ki67-positiven Zellkerne ermittelt.

HRG, 5 %iges humanes Serumalbumin (49,5 Vol.-%); Ringer-Laktat (49,5 Vol.-%); 4 %ige Glucose (1 Vol.-%); proliferierende Hepatozyten (Pfeile); Skalierung: 100 µm

Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SE);  $n = 4$ ; \*  $p < 0,05$

Da die Stammzellen auf Veränderungen der Proliferationsrate keine Auswirkung hatten, kann man davon ausgehen, dass sie unter den untersuchten Bedingungen weder eine pro-proliferative noch eine pro-tumorigene Wirkung hatten.

#### 4.3.5 Die transplantierten Stammzellen zeigten keine pro-inflammatorische Wirkung auf das Lebergewebe

Inflammation ist ein wichtiger protektiver Prozess, der initial zur Bereinigung von Gewebeschädigungen beiträgt. Auslöser sind Zytokine und Chemokine, die entweder gewebe-residente oder zirkulatorische Entzündungszellen ins geschädigte Gewebe rekrutieren (Karin & Clevers 2016). Chronisch inflammatorische Prozesse führen jedoch zur dauerhaften Schädigung und zum pathologischen Gewebeumbau in der Leber, wie z.B. bei der Fibrose, die sich zur Zirrhose und letztlich zum Leberkrebs entwickeln kann (Bishayee 2014). Für MSC wurde gezeigt, dass sie eine anti-inflammatorische Wirkung zeigen (Singer & Caplan 2011). Um auszuschließen, dass ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen zu einer Entzündungsreaktion und/oder dadurch zu einer Leberschädigung führen können, wurde die Auswirkung der applizierten Stammzellen auf die Expression hepatischer Entzündungsmarker, z.B. pro-inflammatorische Zytokine sowie Apoptosemarker wie Caspasen, untersucht. Da Makrophagen in der hepatischen Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle spielen (Koyama & Brenner 2017), wurde auch die Anzahl der Makrophagen als ein Anzeichen für ein Entzündungsgeschehen bestimmt.

	Kontrollgruppe		ABCB5 <sup>+</sup> Stammzellen			
	HRG Trägerkontrolle		undifferenziert		hepatogen differenziert	
IL-1 $\beta$						
IL-6						
TNF $\alpha$						
Caspase 3						
Caspase 9						
B2M						
TATA						
Zeitpunkt	2 Tage 7 Wochen		2 Tage 7 Wochen		2 Tage 7 Wochen	

Abbildung 38: Dokumentation der PCR-Produkte von repräsentativen Proben (n = 4) zum Nachweis von Entzündungsmarkern aus Lebergewebe von Pfp/Rag2<sup>-/-</sup> Mäusen 2 Tage und 7 Wochen nach der Transplantation von undifferenzierten und 14 Tagen hepatogen differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen.

B2M,  $\beta$ 2-Mikroglobulin; Casp, Caspase; HRG, 5 %iges humanes Serumalbumin (49,5 Vol.-%), Ringer-Laktat (49,5 Vol.-%), 4 %ige Glucose (1 Vol.-%); IL-6, Interleukin-6; IL-1 $\beta$ , Interleukin-1 $\beta$ ; TNF $\alpha$ , Tumornekrosefaktor  $\alpha$

Die Expression von Interleukin-1 $\beta$  und Interleukin-6, pro-inflammatorische Marker in der Leber, war in Tieren, die hepatogen differenzierte ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen erhielten, zum Zeitpunkt 7 Wochen signifikant niedriger im Vergleich zur Kontrollgruppe, in Bezug auf Interleukin-6 auch zu Tieren, die undifferenzierte ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen erhielten ( $p < 0,05$ ; Abbildung 39). Demgegenüber war der Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , ein weiteres pro-inflammatorisches Zytokin in der Leber zum Zeitpunkt 2 Tage nach Zelltransplantation in der Kontrollgruppe signifikant niedriger im Vergleich zu den anderen Gruppen ( $p < 0,05$ ; Abbildung 39). Die Caspase 3, einem Marker für die extrinsische Apoptose, war in Tieren, die hepatogen differenzierte ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen erhielten, zum Zeitpunkt 7 Wochen signifikant niedriger im Vergleich zu Tieren, die undifferenzierte ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen erhielten (Abbildung 39 und Abbildung 39).

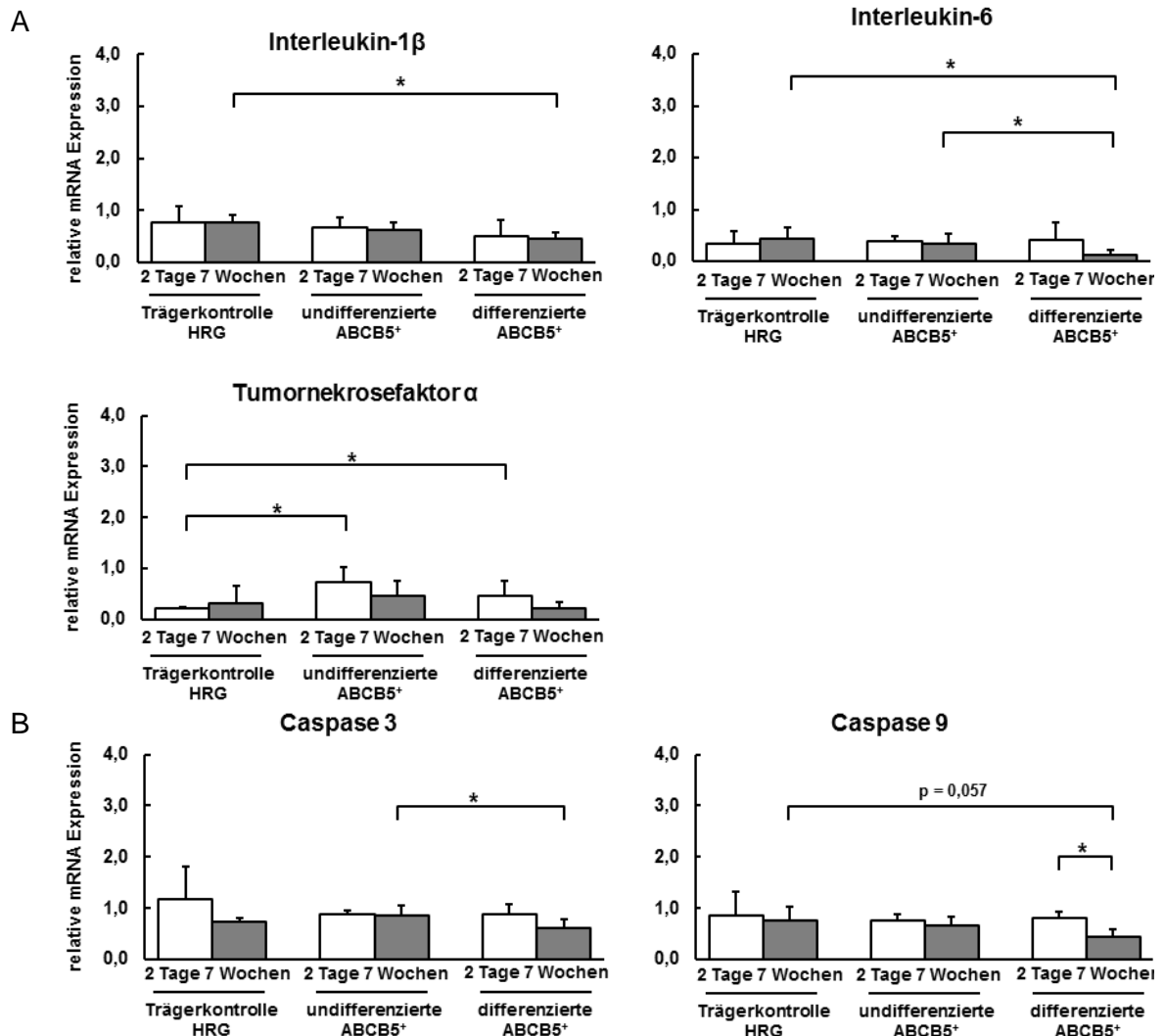


Abbildung 39: Relative mRNA Expression von Markern der Inflammation (A) und Apoptose (B) in Lebergewebe von Pfp/Rag2<sup>-/-</sup> Mäusen 2 Tage und 7 Wochen nach der Transplantation von undifferenzierten und 14 Tagen hepatogen differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen.

Die Analyse erfolgte mittels RT-PCR. Dargestellt sind Expressionsprofile zum Zeitpunkt 2 Tage (weiße Säulen) und 7 Wochen (hellgraue Säulen). Zur Normalisierung wurden die Haushaltsgene B2M und TATA verwendet. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SE);  $n = 4$ ; \*  $p < 0,05$

Die Caspase 9, ein Marker für die intrinsische Apoptose, war in Tieren, die hepatogen differenzierte ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen erhielten, zum Zeitpunkt 7 Wochen signifikant niedriger im Vergleich zum Zeitpunkt 2 Tage ( $p < 0,05$ ; Abbildung 39 und Abbildung 39).

Neben den möglichen Veränderungen der Genexpression von pro-inflammatorischen Entzündungs- und Apoptosemarkern wurde auch die Anzahl der Makrophagen mittels des Oberflächenmarkers F4/80 2 Tage nach der Stammzellapplikation bestimmt. In Abbildung 40 A sind repräsentative Bildausschnitte ( $n = 5$ ) der F4/80-Färbung zu sehen. Die quantitative Analyse ergab, dass zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied zu sehen war (Abbildung 40 B). Im Durchschnitt lag die Anzahl der Makrophagen je Bildausschnitt bei 53. Mit Ausnahme der erhöhten Mengen des Tumornekrosefaktors  $\alpha$  zum Zeitpunkt 2 Tage nach Zelltransplantation gab es also keine signifikanten Veränderungen von Entzündungsmarkern nach Stammzelltransplantation. Auch die Erhöhung des Tumornekrosefaktors  $\alpha$  war 7 Wochen nach Transplantation nicht mehr nachweisbar. Daher zeigten die applizierten Zellen insgesamt keine nachhaltige anti- oder pro-inflammatorische Wirkung.

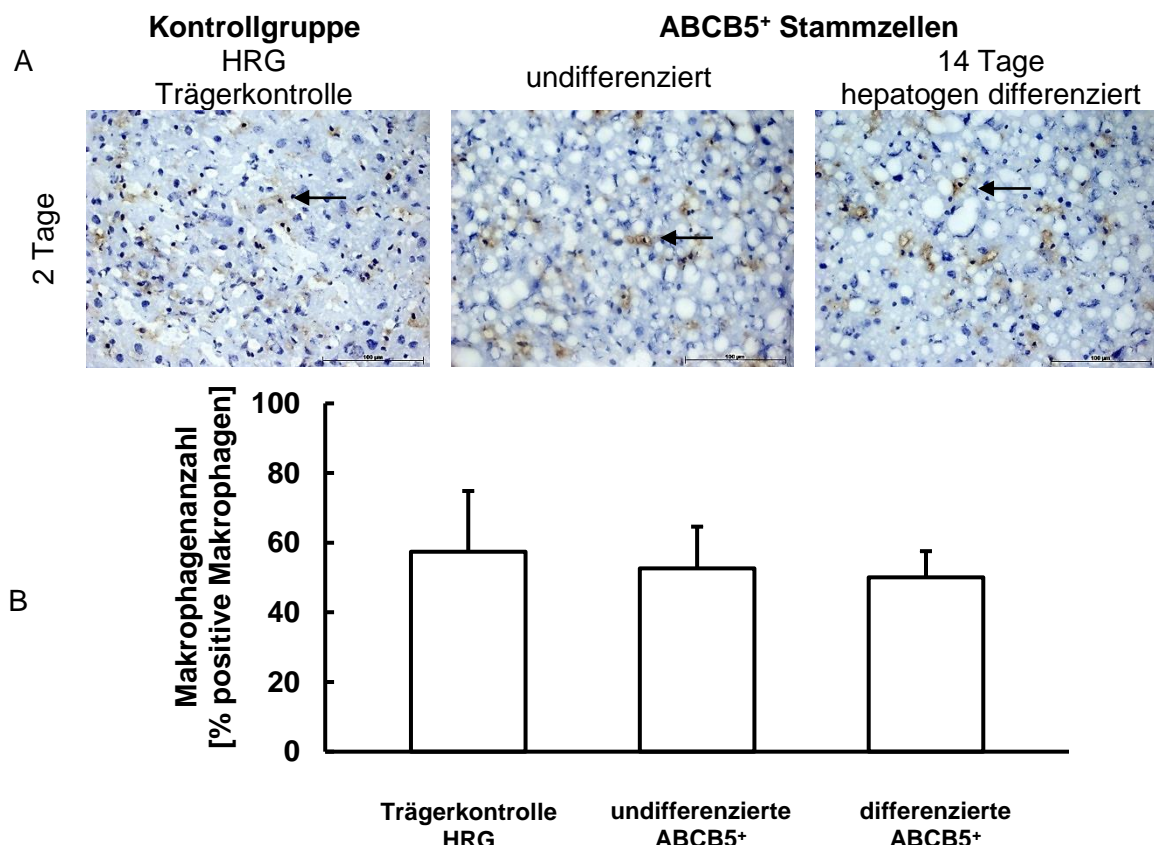


Abbildung 40: Nachweis des Makrophagenmarkers F4/80.

Gezeigt werden repräsentative Bildausschnitte ( $n = 5$ ) der Lebern (A) von Pfp/Rag2<sup>-/-</sup> Mäusen 2 Tage nach der Transplantation von undifferenzierten und 14 Tagen hepatogen differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen. In (B) wurde die Anzahl der Makrophagen quantitativ durch Auszählung der F4/80-positiven Zellen ermittelt.

HRG, 5 %iges humanes Serumalbumin (49,5 Vol.-%); Ringer-Laktat (49,5 Vol.-%); 4 %ige Glucose (1 Vol.-%); Skalierung: 100  $\mu$ m

## 5 Diskussion

### 5.1 ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen lassen sich mit dem angewendeten Protokoll nicht in hepatozytäre Zellen differenzieren

Viele Studien konnten zeigen, dass mesenchymale Stammzellen *in vitro* unter der Verwendung eines einfachen Protokolls (vgl. 3.1.1) mit spezifischen Wachstumsfaktoren in Hepatozyten ähnliche Zellen differenzieren und leberspezifische Eigenschaften entwickeln. Nach der Applikation von hepatogen differenzierten Stammzellen migrieren diese in das Gewebe und können dort die Leberregeneration positiv unterstützen (Aurich *et al.* 2007; 2009; Sgodda *et al.* 2007). Wichtige Kriterien zur Klassifizierung von mesenchymalen Stammzellen sind die Plastikadhärenz, die Differenzierung in Adipozyten, Chondroblasten und Osteoblasten sowie die Expression von spezifischen Oberflächenmarkern (Dominici *et al.* 2006).

Bei der Klassifizierung der untersuchten Parentalstammzellen und den daraus selektierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen aus der menschlichen Haut zeigten sich sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede zu mesenchymalen Stammzellen. Sowohl die Parentalstammzellen als auch die ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen adhärten auf Plastikzellkulturschalen. Neben der Plastikadhärenz zeigten die Parentalstammzellen bei Anwendung der vorliegenden Protokolle eine multiple Differenzierungsfähigkeit. Die ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen wiesen hingegen ein deutlich schlechteres Differenzierungspotential auf. Insbesondere die Differenzierung in Adipozyten war nach vier Wochen nur ansatzweise erkennbar. Daraus kann man schließen, dass die Parentalstammzellen neben den ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen noch weitere Subpopulationen enthielten, die eher multiples Differenzierungspotential aufwiesen. Diese gilt es jedoch zu isolieren und weiter zu charakterisieren. Dennoch exprimierten beide Populationen typische Stammzellmarker wie CD29, CD90 und CD105. Unterschiede zeigten sich in der Expression der hämatopoetischen Oberflächenmarker CD34 und CD45, die in geringen Mengen exprimiert wurden. Unter Berücksichtigung der Kriterien der *International Society for Cellular Therapy* zeigten die Parentalstammzellen somit die Eigenschaften mesenchymaler Stammzellen. Die ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen wiesen zwar ein ähnliches Expressionsprofil auf, zeigten jedoch eine geringe multiple Differenzierungsfähigkeit und entsprechen demnach nicht den vorgegebenen Kriterien für MSC (Dominici *et al.* 2006). Eine Studie von Meier *et al.*, die sich mit den ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen während des Alterns beschäftigte, bestätigt die vorliegenden Ergebnisse. Auch hier wurde die Expression von mesenchymalen Stammzellmarkern nachgewiesen sowie eine geringe und variable Expression des hämatopoetischen Stammzellmarkers CD34 (Meier *et al.* 2010).

Ebenfalls war auch die multiple Differenzierung, insbesondere in Adipozyten, eingeschränkt. Erst nach 6 Wochen der Differenzierung zeigten sich erste Einlagerungen von Lipiden (Meier *et al.* 2010). Auch die Studie von Schatton *et al.* belegte die Expression mesenchymaler und das Fehlen von hämatopoetischen Markern (Schatton *et al.* 2015).

Auch die Differenzierung der Parentalstammzellen und ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen in hepatozytäre Zellen stellte sich als unzureichend heraus. Neben dem Fehlen morphologischer Veränderungen hin zu polygonalen, hepatozytären Zellen, nahm auch die Expression leberspezifischer Gene auf RNA-Ebene zwar tendenziell zu, jedoch nicht signifikant und zu keinen der humanen Leber vergleichbaren Werten. Mesenchymale Marker, wie Cytokeratin 7 und  $\alpha$ -SMA, zeigten zudem eine verringerte Expression im Laufe der Kultivierung. Wodurch sich schlussfolgern lässt, dass Parentalstammzellen und ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen ihren mesenchymalen Charakter verloren, jedoch keinen Zuwachs an leberspezifischen oder epithelialen Markern hatten. Hengstler *et al.* haben in einem Review zusammengefasst, dass neben der Morphologie und Expression von hepatozytenspezifischen Markern insbesondere der Nachweis von funktionellen Merkmalen, wie des Fremdstoffmetabolismus, die Synthese und Sekretion u.a. von Albumin und die Einlagerung von Glykogen notwendig sind, um eine Zelle als Hepatozyt zu identifizieren. Diese Definition sollte auch für die Differenzierung von Stammzellen zu Hepatozyten gelten (Hengstler *et al.* 2005). Doch auch hinsichtlich funktioneller Merkmale zeigten sich in der vorliegenden Arbeit keine Entwicklungen hin zu Hepatozyten ähnlichen Zellen. Beide Populationen lagerten nur geringe Mengen von Glykogen ein. Weder die Harnstoffsyntheserate noch die Aktivität von Cytochrom P450-Enzymen zeigten eine zu Maushepatozyten vergleichbare Entwicklungen.

In verschiedenen Studien der Arbeitsgruppe „Angewandte Molekulare Hepatologie“, in der diese Arbeit angefertigt wurde, wurde das selbe etablierte Protokoll zur hepatozytären Differenzierung mesenchymaler Stammzellen verwendet (Stock *et al.* 2010). Es konnte in allen Studien gezeigt werden, dass eine hepatogene Differenzierung von humanen, murinen und porcinen mesenchymalen Stammzellen möglich ist (Aurich *et al.* 2007; Aurich *et al.* 2009; Brückner *et al.* 2014; Sgodda *et al.* 2007; Winkler *et al.* 2015). So zeigte Sgodda *et al.*, dass bereits nach 14 bis 21 Tagen die höchst mögliche hepatogene Differenzierung von MSC aus dem Fettgewebe in hepatozytäre Zellen vorlag. Nach diesem Zeitpunkt verloren die Zellen ihre spezifischen Funktionen wieder (Sgodda *et al.* 2007). Mit dem etablierten Protokoll änderte sich u.a. die Morphologie der MSC. Insbesondere murine Stammzellen entwickelten sich nach der Differenzierung in polygonale, mehrkernige Zellen (Winkler *et al.* 2015). Humane mesenchymale Stammzellen lagerten zudem nach kurzer Zeit Glykogen ein (Aurich *et al.* 2009; Winkler *et al.* 2015).

Auch porcine und murine Stammzellen aus dem Knochenmark und dem subkutanen Fettgewebe zeigten eine PAS-positive Färbung nach kurzer Zeit der Differenzierung (Brückner *et al.* 2014; Sgodda *et al.* 2007). Funktionelle Merkmale, wie die Harnstoffsyntheserate und die Enzymaktivität, sind in diesen Studien im Laufe der hepatogenen Differenzierung und unabhängig vom Gewebeer sprung signifikant gestiegen (Aurich *et al.* 2007; Aurich *et al.* 2009; Brückner *et al.* 2014; Sgodda *et al.* 2007; Winkler *et al.* 2015). Auf transkriptioneller Ebene änderten sich leberspezifische und mesenchymale Marker ebenfalls signifikant. Die leberspezifischen Marker, wie z.B. das Plasmaprotein Albumin, Marker des Stickstoff-Stoffwechsels (Glutamin-Synthetase), des Harnstoff-Zyklus (Carbamoylphosphat-Synthetase I), des Fremdstoffmetabolismus (u.a. CYP 7A1, CYP 3A11, CYP1A1) und epitheliale Marker (Cytokeratin 18) stiegen signifikant an (Aurich *et al.* 2007; Sgodda *et al.* 2007; Winkler *et al.* 2015). Cytokeratin 7 und Cytokeratin 19, sowohl von biliären Zellen als auch von Progenitorzellen der Hepatozyten exprimiert, zeigten einen Anstieg oder einen konstanten Verlauf während der hepatogenen Differenzierung (Sgodda *et al.* 2007; Winkler *et al.* 2015). Der mesenchymale Marker  $\alpha$  smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), wird von aktivierten hepatischen Sternzellen exprimiert (Carpino *et al.* 2005) und wurde während der hepatogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen konstant exprimiert (Winkler *et al.* 2015). Diese Studien zeigten also zusammenfassend, dass eine hepatogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen mit dem vorliegenden Protokoll möglich ist. Da jedoch weder in den Parentalstammzellen noch in den ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen Kriterien für Hepatozyten ähnlichen Zellen (Hengstler *et al.* 2005) nachgewiesen werden konnten, scheint sich mit dem vorliegenden Protokoll keine bzw. keine nennenswerte hepatogene Differenzierung erzielen zu lassen.

Die zellbiologische und biochemische Charakterisierung sowie der Vergleich mit Studien, die ebenfalls mit dem hier angewendeten Protokoll gearbeitet haben, lassen den Schluss zu, dass es sich daher bei beiden Populationen um Zellen mit anderen Eigenschaften als denen von mesenchymalen Stammzellen handelt. Dies impliziert, dass eine hepatogene Differenzierung mit der Anwendung eines anderen, spezifischeren Protokolls durchaus erreicht werden könnte. Unter anderem könnten Protokolle, welche die Embryonalentwicklung der Leber nachvollziehen, in Betracht gezogen werden. Insbesondere die Verwendung von Oncostatin M scheint für die hepatogene Differenzierung von besonderer Bedeutung zu sein (Kamiya *et al.* 2001; Miyajima *et al.* 2000). So konnte Banas *et al.* in ihrer Studie unter der Verwendung eines 2-stufigen Protokolls mit Oncostatin M eine Änderung der Morphologie humaner mesenchymaler Stammzellen aus dem Fettgewebe hin zu Hepatozyten ähnlichen Zellen zeigen (Banas *et al.* 2007).



Neben dem Gewinn funktioneller hepatozytärer Merkmale entwickelten sich die Zellen zu runden oder ovalen Zellen mit einer polygonalen Struktur, mit engen Zell-Zell-Interaktionen und sichtbaren Gallenkanälchen, ähnlich zu primären Hepatozyten (Banas *et al.* 2007). Auch Lee *et al.* verwendeten dieses Protokoll (Lee *et al.* 2004) und konnten im Laufe der hepatogenen Differenzierung von humanen Knochenmarkstammzellen eine Änderung der Morphologie sowie den Zugewinn funktioneller Merkmale, wie die Einlagerung von Glykogen und einen Anstieg der Harnstoffsyntheserate, nachweisen (Lee *et al.* 2004). Die Verwendung des 2-stufigen Protokolls benötigt jedoch wesentlich länger zur hepatogenen Differenzierung von MSC, nämlich im Durchschnitt vier bis sechs Wochen bis zur Änderung der Morphologie und Ausbildung funktioneller Merkmale (Glykogeneinlagerung, Harnstoffsynthese, Albuminsynthese) (Banas *et al.* 2007; Banas *et al.* 2009; Lee *et al.* 2004; Wang *et al.* 2014; Yin *et al.* 2015).

Da die Parentalstammzellen und ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen immerhin teilweise Eigenschaften von MSC aufwiesen, kann man abschließend also vermuten, dass unter Verwendung spezifischerer Protokolle und längerer Differenzierungsphasen deren hepatogene Differenzierung möglich sein könnte. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass dies mit für MSC optimierten Protokollen grundsätzlich nicht gelingt. Es blieben andere Strategien, wie die Verwendung von aus ABCB5 abgeleiteten induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS) mit anschließender hepatogener Differenzierung, zu diskutieren.

### **5.2 Undifferenzierte und differenzierte ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen sezernieren hepatotrope Faktoren**

Sowohl undifferenzierte als auch differenzierte mesenchymale Stammzellen sezernieren Botenstoffe wie Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren und stehen im direkten Zell-Zell Kontakt mit dem umliegenden Gewebe (Christ *et al.* 2015). Stammzellen aus unterschiedlichen Geweben zeigen dabei unterschiedliche Sekretomprofile und können sich somit auch unterschiedlich auf das Gewebe auswirken (Hsiao *et al.* 2012; Konala *et al.* 2016; Kupcova Skalnikova 2013). Neben dem Gewebeursprung spielt auch der Grad der Differenzierung eine wesentliche Rolle (Winkler *et al.* 2016). ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen sezernierten unabhängig vom Differenzierungsgrad unterschiedliche Zytokine, die sowohl die Regeneration, Inflammation als auch Angiogenese der Leber beeinflussen könnten. Es zeigten sich quantitative und qualitative Unterschiede. Die differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen sezernierten mehr unterschiedliche Zytokine, jedoch größtenteils in nur geringem Ausmaß (Abbildung 22). Inwieweit die Quantität und/oder die Qualität eine Rolle bei der Leberregeneration spielt, ist unklar.

Im Vergleich mit anderen MSC gibt es dennoch Ähnlichkeiten mit den hier erfassten Sekretomprofilen. Das neutrophilspezifische Chemokin ENA-78 (*epithelial-derived neutrophil-activating peptide 78*) wurde von undifferenzierten und auch differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen sezerniert. Dieses Chemokin wurde auch in humanen MSC aus embryonalen Stammzellen nachgewiesen (Sze *et al.* 2007). Interessanterweise jedoch nicht in anderen MSC aus der humanen Haut (Hsiao *et al.* 2012), aus der auch die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen isoliert wurden. Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt diskutiert, könnte dies weiterhin darauf hindeuten, dass die hier verwendeten Zellen nicht identisch mit MSC aus der Haut sind. In der vorliegenden Untersuchung wurde ENA-78 nur in zwei der vier Zellpräparationen der undifferenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen nachgewiesen, in den differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen hingegen in jeder Zellpräparation (Anlage 2). Dies zeigt interindividuelle Unterschiede im Sekretionsprofil der Zellen unterschiedlicher Spender und des Differenzierungsgrades auf, die für die evtl. therapeutische Nutzung von großer Bedeutung sein könnte. ENA-78 wurde klinisch bereits erfolgreich bei der Behandlung von durch Acetaminophen verursachte Leberschäden eingesetzt (Hogaboam *et al.* 1999). Da die pleiotrope Wirkung von Stammzellen sicher von Vorteil gegenüber der Verwendung von ENA-78 alleine wäre, müsste trotzdem eine Analyse des Spendermaterials vor der Verwendung durchgeführt werden, um den Erfolg der Behandlung zu stratifizieren.

Wie ENA-78 ist auch uPA an der Leberregeneration beteiligt (Kim *et al.* 2000). Der entsprechende Rezeptor uPAR wurde in der vorliegenden Arbeit nur von undifferenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen sezerniert. Dies stimmt mit Daten aus humanen MSC aus Knochenmark und subkutanem Fettgewebe überein, welche undifferenziert, aber auch nach hepatogener Differenzierung uPAR sezernierten (Winkler *et al.* 2016). uPAR spielt allgemein eine wichtige Rolle bei der Wundheilung als Zielgen von HIF-1 $\alpha$  (Dimova & Kietzmann 2008; Heissig *et al.* 2015). Es kann somit auch die Leberregeneration positiv beeinflussen. HIF-1 $\alpha$  (*hypoxia inducible factor  $\alpha$* ), wird unter Hypoxie im Wundgewebe induziert, unterstützt die Hochregulierung von wichtigen Wachstumsfaktoren, wie z.B. FGF-2 und HGF (Dimova & Kietzmann 2008; Heissig *et al.* 2015; Tamama *et al.* 2011). uPAR bewirkt zudem die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen und die Rekrutierung inflammatorischer Zellen (Heissig *et al.* 2015). Insbesondere die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen scheint in der frühen Phase der Leberregeneration einen positiven Beitrag zur hepatischen Remodellierung der Matrix zu haben (Kim *et al.* 2000). Serpin E1, auch als PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor type 1*) bezeichnet, ist der physiologische Inhibitor von uPA und wurde sowohl von undifferenzierten als auch von differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Zelle sezerniert (Bajou *et al.* 2008).

Im Tiermodell und in der Zellkultur konnte gezeigt werden, dass durch die Gabe von Dexamethason und Insulin, zwei Faktoren, die im Medium zur Kultivierung der Stammzellen in der vorliegenden Studie genutzt wurden, PAI-1 anstieg (Dimova & Kietzmann 2008). Somit kann man annehmen, dass die Sekretion von PAI-1 durch die Stammzellen in der vorliegenden Studie durch den Zusatz von Insulin und Dexamethason zum Kulturmedium stimuliert wurde. In Übereinstimmung mit der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass PAI-1 auch von humanen und murinen (Ratte) MSC aus Knochenmark und Fettgewebe sezerniert wurde (Nakanishi *et al.* 2011; Winkler *et al.* 2016). PAI-1 ist ein wichtiger Faktor der Akut-Phase-Reaktion und steht unter der transkriptionellen Kontrolle des HIF-1 $\alpha$  (Dimova & Kietzmann 2008, Heissig *et al.* 2015). Somit handelt es sich bei PAI-1, ebenso wie bei uPAR, um einen hepatotropen Faktor, der die Leberregeneration positiv beeinflussen könnte.

Die Sekretion von HGF ist schwierig zu beurteilen, da dem verwendeten Kulturmedium HGF zugesetzt wurde (vgl. 3.1.2). Allerdings wurde eine Mediumkontrolle als Negativkontrolle mitgeführt und bei der Berechnung berücksichtigt. Somit kann man davon ausgehen, dass die ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen nach der hepatogenen Differenzierung signifikante Mengen an HGF sezernierten. HGF spielt eine prominente Rolle bei der Leberregeneration. In der Leber wirkt es als Mitogen und fördert dadurch die Proliferation der Hepatozyten (Michalopoulos 2007, 2010). Somit könnten differenzierte ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen durch die Sezernierung von HGF pro-proliferativ wirken und einen wichtigen hepatotropen Faktor zur Leberregeneration beisteuern.

Die sowohl von undifferenzierten als auch von differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen sezernierten Faktoren Interleukin-8, Interleukin-17, SDF-1 $\alpha$  (*stromal cell-derived factor 1*  $\alpha$ ), Interferon- $\gamma$ , EMMPRIN (Basigin) und MIF (*macrophage migration inhibitory factor*) sind pro-inflammatorisch wirkende Zytokine und Chemokine. Sie rekrutieren Makrophagen sowie MSC und induzieren Faktoren der Granulopoese, neutrophilspezifische Chemokine (CXCL1, CXCL2, ENA-78, Interleukin-8), Mediatoren der Akut-Phase-Antwort (Interleukin-6) und weitere pro-inflammatorische Zytokine (Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , Interleukin-1 $\beta$ , *receptor activator of NF- $\kappa$ B Ligand*) (Beringer *et al.* 2016; Bernhagen *et al.* 2007; Hao *et al.* 2015; Leng *et al.* 2003; Zenobia & Hajishengallis 2015). Sie werden auch von anderen humanen MSC aus der Haut, Knochenmark und Fettgewebe sezerniert (Hsiao *et al.* 2012; Nakanishi *et al.* 2011; Winkler *et al.* 2016) und spielen eine wichtige Rolle bei der Wundheilung (Castro-Manrreza & Montesinos 2015; Christ *et al.* 2015; Hao *et al.* 2015). Somit könnten diese für die Leberregeneration nach Teilresektion oder auch bei anderen chronischen und akuten Lebererkrankungen therapeutisch von Nutzen sein.

Neben den pro-inflammatorischen Zytokinen wurden auch Faktoren der Angiogenese sezerniert, die sich auf die Wundheilung und Gefäßneubildung der Leber auswirken könnten. Angiogenin, ein pro-angiogenes Zytokin und von undifferenzierten sowie auch von differenzierten Zellen sezerniert, regulierte *in vitro* die Zellproliferation von humanen Endothelzellen und die Differenzierung von zirkulierenden Angiogenesezellen sowie die Neovaskularisierung während der Wundheilung (Pan *et al.* 2012). In der Studie von Hsiao *et al.* konnte gezeigt werden, dass dermale mesenchymale Stammzellen ebenfalls Angiogenin sezernierten (Hsiao *et al.* 2012). Pentraxin-3 und Thrombospondin 1, zwei vom Differenzierungsgrad unabhängig sezernierte Zytokine, wirken hingegen anti-angiogen (Armstrong & Bornstein 2003; Presta *et al.* 2007; Vilahur & Badimon 2015). In humanen Knochenmarkstammzellen wurde Thrombospondin 1, den Ergebnissen der vorliegenden Studie entsprechend, ebenfalls verstärkt in undifferenzierten gegenüber differenzierten MSC sezerniert (Winkler *et al.* 2016). Pentraxin-3 wurde hingegen, ebenfalls der vorliegenden Studie entsprechend, sowohl von undifferenzierten als auch hepatogen differenzierten humanen MSC aus Knochenmark und subkutanem Fettgewebe im gleichen Maße gebildet (Winkler *et al.* 2016).

Das Zytokin Dickkopf-1 (DKK-1) ist ein Antagonist des Wnt-Signalwegs. In der Leber sind Wnts Morphogene, die die Spezifizierung in perivenöse Hepatozyten regulieren (Gebhardt & Hovhannisyan 2010; Gougelet & Colnot 2012). Im Gegensatz zur Studie von Winkler *et al.*, wurde DKK-1 nur von undifferenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen sezerniert. Winkler *et al.* konnte zeigen, dass DKK-1 von hepatogen differenzierten MSC aus Knochenmark stärker sezerniert wurde als von undifferenzierten Stammzellen (Winkler *et al.* 2016). Neben der morphogenen Wirkung setzte DKK-1 die Aktivierung von Ito-Zellen herab und konnte dadurch Fibrose in der Leber unterdrücken (Cheng *et al.* 2008). Somit könnten undifferenzierte ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen zur anti-fibrotischen Therapie bei Leberzirrhose eingesetzt werden. Diese Theorie könnte eine weitere Studie mit ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen bestätigen, die von Projektpartnern in Mannheim durchgeführt wird. Hier wird der Effekt von ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen in einem Fibrosemodell in der Maus untersucht. Sie stellten ebenfalls eine anti-fibrotische und anti-inflammatorisch Wirkung der Zellen fest (Hartwig *et al.* 2017).

Ein ausschließlich von differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen sezerniertes Zytokin ist Chitinase 3-like 1. Es kann den Phosphoinositid-3-Kinase/Akt-Signalweg sowie den MAP-Kinase-Signalweg aktivieren und dadurch die Zellmigration, Zellproliferation und das Überleben der Zellen fördern (Lee *et al.* 2011). Chitinase 3-like 1 wurde auch von hepatogen differenzierten MSC aus Knochenmark und subkutanem Fettgewebe stark sezerniert (Winkler *et al.* 2016).

Dadurch könnten sich die Zellen besser in das Gewebe integrieren, dort proliferieren und im Allgemeinen die Leberregeneration positiv unterstützen. Chitinase 3-like 1 wäre demnach ebenfalls ein wichtiger hepatotroper Faktor für die Leberregeneration.

Die im Folgenden besprochenen Zytokine wurden ausschließlich von differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen sezerniert. Sie zeigen die Relevanz der hepatogenen Differenzierung und die damit einhergehende Entwicklung von hepatotropen Faktoren. So z.B. IGFBP-2 (*insulin-like growth factor binding protein 2*), ein Protein, das positiv mit der Zellproliferation korreliert und die Leberregeneration nach Teilresektion positiv beeinflussen könnte (Sze *et al.* 2007; Wolf *et al.* 2000). IGFBP-2 konnte ebenso wie ENA-78 in humanen MSC aus embryonalen Stammzellen sowie in hepatogen differenzierten MSC aus Knochenmark nachgewiesen werden (Sze *et al.* 2007; Winkler *et al.* 2016; Wolf *et al.* 2000).

Gro- $\alpha$  (*growth related oncogenes*), MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*) und VCAM-1 (*vascular cell adhesion protein 1*) sind für die Rekrutierung von Leukozyten und Makrophagen verantwortlich und fördern so die Initiation der Wundheilung, im chronischen Verlauf jedoch die Progression zur chronischen Inflammation (Dutta *et al.* 2015; Marra & Tacke 2014). Gro- $\alpha$  sowie MCP-1 konnten auch bei anderen humanen MSC aus der Haut nachgewiesen werden (Hsiao *et al.* 2012). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie, wurden sie von humanen, hepatogen differenzierten MSC aus Knochenmark und subkutanem Fettgewebe im Vergleich zu undifferenzierten MSC stärker sezerniert (Winkler *et al.* 2016). Gro- $\alpha$ , MCP-1 und VCAM-1 könnten so bei chronischen und akuten Lebererkrankungen von therapeutischem Nutzen sein.

Ebenso wurde GDF-15 (*growth/differentiation factor 15*), die vorliegenden Ergebnisse bestätigend, in der Studie von Winkler *et al.* verstärkt von hepatogen differenzierten MSC sezerniert (Winkler *et al.* 2016). GDF-15 ist ein autokriner Regulator von Makrophagen, der in der späteren Phase der Inflammation limitierend auf die Makrophagenaktivierung wirkt und somit auch die Leberregeneration beeinflussen könnte (Bootcov *et al.* 1997). Die von differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen sezernierte Dipeptidylpeptidase 4 (DPP4) wirkt sich positiv auf die Stimulierung von T-Lymphozyten sowie deren Proliferation aus (Klemann *et al.* 2016). Differenzierte humane MSC, insbesondere aus Fettgewebe zeigten ähnliche Ergebnisse (Winkler *et al.* 2016). Diese Daten bestätigen, dass hepatogen differenzierte ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen immunmodulatorische Wirkung haben könnten, eine der prominenten biologischen Eigenschaften von MSC (Block *et al.* 2009; Nicolas *et al.* 2016; Prockop & Youn Oh 2012; Squillaro *et al.* 2016; Uccelli *et al.* 2008).

Zusammenfassend zeigte sich also, dass ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen unabhängig vom Differenzierungsgrad eine Vielzahl an verschiedenen Zytokinen sezernierten. Dabei gab es quantitative und qualitative Unterschiede. Im Vergleich zu anderen Studien weist das Sekretionsprofil der undifferenzierten und auch der differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen Ähnlichkeiten auf zu humanen MSC aus Knochenmark, subkutanem Fettgewebe oder der Haut (Hsiao *et al.* 2012; Winkler *et al.* 2016). Dennoch ist klar zu sagen, dass von hepatogen differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen mehr hepatotrope Faktoren sezerniert wurden. Diese interagieren u.a. mit dem innate und adaptiven Immunsystem, wirken sich positiv auf die Zellproliferation aus und sind an wichtigen Signalwegen zur Wundheilung beteiligt, wie z.B. dem HIF-1 Signalweg (4066) (Bootcov *et al.* 1997; Dimova & Kietzmann 2008; Dutta *et al.* 2015; Marra & Tacke 2014; Michalopoulos 2010). Hepatogen differenzierte ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen könnten sich demnach positiv auf die Leberregeneration nach Teilresektion auswirken und zudem bei anderen chronischen und akuten Lebererkrankungen therapeutisch von Nutzen sein.

### **5.3 Die hepatische Applikation von ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen hat keine pathophysiologischen Einflüsse auf die Leberregeneration und -funktion**

Wie in der Literatur beschrieben, weisen MSC *in vivo* allgemein bekannte immunmodulatorische und anti-inflammatorische Wirkungen (Bunnell *et al.* 2010; Kim & Cho 2016; Prockop & Youn Oh 2012; Singer & Caplan 2011) sowie pro-proliferative und anti-apoptotische Wirkungen auf (Block *et al.* 2009; Christ *et al.* 2015; Nicolas *et al.* 2016; Prockop & Youn Oh 2012; Squillaro *et al.* 2016; Uccelli *et al.* 2008). Diese Eigenschaften machen humane MSC interessant für die klinische Anwendung zur Therapie bei Lebererkrankungen. In der Tat ergibt die Suche mit den Stichworten „Mesenchymal stem cells AND liver“ auf der Website [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) 44 Einträge (Stand 13.10.2017) zu laufenden und bereits abgeschlossenen klinischen Studien der Phase I/II. Neben den oben genannten Eigenschaften von MSC sind eine mögliche anti-fibrotische, allerdings auch pro-fibrotische Wirkung (Alison *et al.* 2009; Kim *et al.* 2014) sowie pro-tumorigene Wirkungen (Jia *et al.* 2016; Lindoso *et al.* 2015; Mathew *et al.* 2016; Yamada *et al.* 2016) von MSC im Empfängerewebe beschrieben. In diesem Zusammenhang sollte in der vorliegenden Studie untersucht werden, inwieweit humane undifferenzierte oder hepatogen differenzierte ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen nach hepatischer Transplantation im xenogenen Mausmodell mit diesen Befunden übereinstimmen oder Nebenwirkungen auslösten. Es wurde die Transplantation in die Leber untersucht, da diskutiert wird, ob ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen evtl. für die Therapie chronischer Lebererkrankungen geeignet sein könnten.

Es wurde davon ausgegangen, dass für eine evtl. zu beobachtende Wirkung transplantierte Zellen in der Leber oder zumindest in der Milz als Applikationsweg gefunden werden sollten. Jedoch waren weder 2 Tage noch 7 Wochen postoperativ mittels des humanspezifischen Antikörpers Ku80 Zellen im Lebergewebe nachweisbar. Am Tag 2 postoperativ zeigten sich lediglich einige wenige positive Areale in der Milz. In der Studie von Allard *et al.* konnte gezeigt werden, dass der Antikörper Ku80 durchaus geeignet ist, um undifferenzierte und neuronal differenzierte induzierte pluripotente Stammzellen in unterschiedlichen Geweben, u.a. auch Lebergewebe, nachzuweisen (Allard *et al.* 2014). Bis zu 60 Tage postoperativ wurden noch Ku80 positive Zellen im Gewebe gefunden. In der Studie von Hsu *et al.* konnten ebenfalls transplantierte humane adulte Leberstammzellen im Lebergewebe mittels Ku80 nachgewiesen werden (Hsu *et al.* 2017). Auch in der vorliegenden Studie wurde die Spezifität und Funktionalität des Antikörpers bestätigt (vgl. 4.3.1). Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Zellen nicht oder nur in geringem Umfang in der Milz verblieben waren und wahrscheinlich bald nach der Applikation eliminiert wurden. Das bedeutet jedoch nicht, dass keine Wirkung erzielt wurde, da in Ratten und Schweinen gezeigt wurde, dass MSC kurzfristig über die Sekretion parakrin wirkender Faktoren die Leberegeneration nach Teilresektion begünstigten (Tautenhahn *et al.* 2016; 2017).

Die Applikation der ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen hatte keine schwerwiegenden Folgen für die Tiere, wie die Analyse des Allgemeinzustandes zeigte. Mit Ausnahme der Leber waren die Organ-Körpergewichtsverhältnisse aller untersuchten Organe 2 Tage und 7 Wochen postoperativ in allen Behandlungsgruppen gleich. Die Lebergewichte waren erwartungsgemäß 2 Tage nach Applikation aufgrund der erfolgten Leberteilresektion niedriger als nach 7 Wochen. Zu letzterem Zeitpunkt waren die Leber-Körpergewichtsverhältnisse in allen Behandlungsgruppen identisch, so dass man davon ausgehen kann, dass die Stammzellbehandlung keinen Einfluss auf die Leberregeneration hatte.

Diese Vermutung wurde im Wesentlichen durch die Bestimmung der Transaminasen bestätigt. Erwartungsgemäß stiegen die Enzymaktivitäten von Aspartat-Aminotransferase (AST) sowie der Alanin-Aminotransferase (ALT) aufgrund der durch die partielle Hepatektomie verursachten Leberschädigung an. Diese war jedoch nur in den mit undifferenzierten, nicht mit hepatogen differenzierten Stammzellen behandelten Tieren gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht. 7 Wochen nach der Operation waren die Transaminasen in allen Gruppen gleich, sodass dadurch die Annahme gestützt wird, dass die Stammzellbehandlung keinen Einfluss auf die Leberregeneration hatte. Die Enzymaktivitäten von Transaminasen dienen zudem als unabhängiger Prädiktor für postoperative Morbidität und Mortalität und sind daher klinisch relevant (Olthof *et al.*

2016). Veränderungen von Transaminasen nach Leberteilresektion konnte im Zusammenhang mit der Applikation von Stammzellen bereits in verschiedenen Human- und Tierstudien gezeigt werden (Boleslawski *et al.* 2014; Di Domenico *et al.* 2010; Ezquer *et al.* 2017). In der Studie von Ezquer *et al.* wurden normal- und übergewichtigen Mäusen nach einer 70 %igen Hepatektomie mesenchymale Stammzellen über die Schwanzvene appliziert. Es zeigte sich eine signifikant niedrigere Enzymaktivität von ALT in beiden Gruppen im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (Ezquer *et al.* 2017). Auch bei akuter Leberschädigung, zeigte sich in der Studie von Wang *et al.*, eine signifikante Verringerung der Transaminasen bei Mäusen, die humane hepatogen differenzierte mesenchymale Stammzellen aus der Nabelschnur erhielten (Wang *et al.* 2014). Eine Studie, die die Applikation von murinen mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark nach orthotoper Lebertransplantation untersuchte, zeigte ähnliche Ergebnisse. 7 Tage postoperativ war die Enzymaktivität von AST und ATL im Vergleich zur Kontrolle signifikant niedriger (Sun *et al.* 2015). Diese Ergebnisse wurden in der vorliegenden Studie nicht bestätigt, da weder undifferenzierte noch differenzierte ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen die Transaminasen signifikant verringerten.

Die Triglyceride waren im Serum in den mit undifferenzierten, nicht mit hepatogen differenzierten Stammzellen behandelten Tieren gegenüber der Kontrollgruppe 2 Tage postoperativ signifikant erhöht. Auch der histologische Nachweis der Lipidakkumulation zeigte zum selben Zeitpunkt eine tendenziell höhere Lipideinlagerung in mit undifferenzierten Stammzellen behandelten Tieren. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Stammzellen den hepatischen Lipidmetabolismus beeinflussten. Diese in allen Gruppen beobachtete vorübergehende hepatische Steatosis, wird 12 bis 24 h nach einer partiellen Hepatektomie durch die regenerierende Leber verursacht (Huang & Rudnick 2014). Man nimmt an, dass durch Lipolyse im Fettgewebe freie Fettsäuren aus den Adipozyten freigesetzt und diese in der Leber akkumuliert werden. Da postoperativ der hepatische ATP Gehalt sinkt, dienen die freien Fettsäuren als Quelle für neu produziertes ATP, verursacht durch den Abbau über die  $\beta$ -Oxidation in den Mitochondrien (Huang & Rudnick 2014). Mesenchymale Stammzellen könnten sich nun positiv auf die Lipidakkumulation auswirken (Christ *et al.* 2015). Einerseits könnten sie den Abbau der freien Fettsäuren in den Adipozyten verringern, aber auch direkt in den Metabolismus der Hepatozyten eingreifen (Christ *et al.* 2015). In einer Studie von Newberry *et al.* konnte gezeigt werden, dass 6 h nach partieller Hepatektomie die Triglyceride gesunken waren und anschließend wieder anstiegen (Newberry *et al.* 2008) und zwar sowohl in der Kontrollgruppe als auch bei Tieren, bei denen die Lipidakkumulation genetisch eingeschränkt war (L-Fabp<sup>-/-</sup> Maus). Erst 48 h postoperativ stiegen die Triglyceride im Serum langsam wieder an.



Da kein präoperativer Wert der Triglyceride in der vorliegenden Studie bestimmt wurde, jedoch ebenso wie bei Newberry *et al.* die Triglyceride wieder anstiegen, scheinen die Ergebnisse tendenziell übereinzustimmen. Neben den Triglyceriden im Serum analysierten Newberry *et al.* auch die hepatischen Triglyceride. In der Kontrollgruppe und in L-Fabp<sup>-/-</sup> Mäusen waren postoperativ die hepatischen Triglyceride stark angestiegen (Newberry *et al.* 2008). Auch in der Studie von Tautenhahn *et al.* stiegen die hepatischen Triglyceride nach partieller Hepatektomie bei *F344-Fisher* Ratten an. Durch die Behandlung mit hepatogen differenzierten mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe zeigte sich jedoch eine stark verringerte Lipidakkumulation (Tautenhahn *et al.* 2016). Im direkten Vergleich zu den genannten Studien, verringerten die ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen, unabhängig vom Differenzierungsgrad, die Lipidakkumulation jedoch nicht.

Hinweise auf eine mögliche Interaktion der ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen mit dem Lipidstoffwechsel scheint es dennoch zu geben. Bei der Analyse einiger zentraler Gene des Lipidstoffwechsels auf RNA-Ebene zeigten sich signifikante Unterschiede in der Expression des Fettsäuretransporters FABP1 (*fatty acid-binding protein 1*). Insbesondere in den mit hepatogen differenzierten Stammzellen behandelten Tieren war die Expression von FABP1 signifikant niedriger im Vergleich zur Kontrolle. Auch der regulatorische Transkriptionsfaktor der Fettsäureverwertung PPARα (*peroxisome proliferator-activated receptor α*) zeigte eine geringere Expression in dieser Behandlungsgruppe. Demnach könnten die niedrigeren Expressionen von FABP1 und PPARα auf eine Verminderung der Fettsäureaufnahme und -verwertung hindeuten und somit eine mögliche Erklärung für die tendenziell niedrigere hepatische Lipidakkumulation bei dieser Behandlungsgruppe liefern. Wie weiter oben schon erwähnt, ist es durchaus denkbar, dass mesenchymale Stammzellen direkt in den Metabolismus der Hepatozyten eingreifen und dadurch z.B. die Aufnahme von freien Fettsäuren über die Fettsäuretransporter CD36 und FABP1 (*fatty acid-binding protein 1*) vermindern (Christ *et al.* 2015). Studien zum Einfluss von mesenchymalen Stammzellen auf die Fettsäuretransporter nach partieller Hepatektomie gibt es bisher nicht. Sydor *et al.* stellte in seiner Studie mit C57Bl/6 Mäusen lediglich fest, dass bei einer Standarddiät nach 70 %iger Hepatektomie weder CD36 noch FABP1 signifikant angestiegen waren. PPARα zeigte ebenfalls keinen signifikanten Anstieg (Sydor *et al.* 2013). Auch wenn es in der Expression dieser beiden Schlüsselgene im Lipidstoffwechsel Unterschiede zwischen unbehandelten und mit Stammzellen behandelten Tieren gab, so lässt sich doch festhalten, dass durch die ABCB5<sup>+</sup> Stammzellbehandlung kein pathologischer Einfluss auf die Lipidakkumulation festzustellen war, da es sich bei der postoperativen Lipidakkumulation um einen physiologischen Prozess (Christ *et al.* 2015; Huang & Rudnick 2014) handelt.

Ebenso wie die Lipidakkumulation spielt auch die Proliferation der Hepatozyten nach einer partiellen Hepatektomie eine wesentliche Rolle in der metabolischen Antwort (Farrell 2004; Kohjima *et al.* 2013). Kohjima *et al.* konnten in ihrer Studie zeigen, dass nach einer partiellen Hepatektomie Lipidakkumulation und Proliferationsrate im direkten Zusammenhang stehen. Eine verminderte Lipidakkumulation führte dabei zu einer verzögerten und tendenziell geringeren Proliferation der Hepatozyten mit einer verminderten Leberregeneration (Kohjima *et al.* 2013). Auch in der vorliegenden Studie zeigte sich eine positive Korrelation zwischen Lipidakkumulation und Proliferationsrate. Eine Auswirkung der Stammzellbehandlung auf die Proliferationsrate zeigte sich jedoch nicht, obwohl eine pro-proliferative Wirkung von mesenchymalen Stammzellen bereits mehrfach beschrieben wurde (Christ *et al.* 2015; Nicolas *et al.* 2016; Prockop & Youn Oh 2012; Squillaro *et al.* 2016). In der Studie von Tautenhahn *et al.* konnte der pro-proliferative Effekt bei *F344-Fischer* Ratten nach partieller Hepatektomie nachgewiesen werden. In mit Stammzellen behandelten Tieren zeigte sich 48 h postoperativ im Vergleich zur Kontrolle eine signifikant höhere Proliferationsrate sowie eine signifikant verringerte Apoptoserate (Tautenhahn *et al.* 2016), so dass hier nicht nur der pro-proliferative, sondern auch der für MSC typische anti-apoptotischen Effekt nachgewiesen werden konnte (Block *et al.* 2009; Christ *et al.* 2015; Uccelli *et al.* 2008). Die anti-apoptotische Wirkung konnte in der vorliegenden Studie für die ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen nicht nachgewiesen werden. Daher lässt sich sagen, dass die Stammzellbehandlung weder einen pro-proliferativen noch einen anti-apoptotischen Effekt zeigte und der Anstieg der Proliferationsrate und der hepatischen Lipide ausschließlich physiologischer Natur war.

## 5.5 Schlussfolgerung

Aus den hier gezeigten Daten geht hervor, dass sich die ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen mit dem angewendeten Protokoll nicht in hepatozytäre Zellen differenzieren lassen. Dadurch erscheinen sie nicht sinnvoll für die Anwendung bei der Zelltherapie von Lebererkrankungen, die einen funktionellen Gewebeersatz, wie z.B. bei monogenetischen Stoffwechselerkrankungen, erfordern. Eher ließe sich die Parentalstammzellfraktion für diese Anwendung heranziehen, da diese ein, wenn auch geringes, Potential zur hepatozytären Differenzierung aufwies. Wahrscheinlich beinhaltet diese eine Subpopulation, die als besonders geeignet erscheinen könnte. Allerdings kann man das für die ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen nicht grundsätzlich ausschließen, da sich bei Anwendung anderer Protokolle durchaus eine Differenzierung in hepatozytäre Zellen erzielen lassen könnte.

Wichtig ist jedoch, dass die hepatische Applikation der ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen keine auffälligen pathologischen Nebenwirkungen hervorrief. Es zeigten sich im Lebergewebe keine Nekrosen, Tumore, chronisch entzündliche oder fibrotische Veränderungen. Nach partieller Hepatektomie war die Leberschädigung durch die Behandlung mit ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen nicht erhöht, allerdings auch nicht verbessert. Daraus kann man jedoch nicht schließen, dass die Stammzellen grundsätzlich keinen therapeutischen Nutzen haben könnten. Die Tatsache, dass sie Mediatoren sezernieren, die den Gewebeumbau begünstigen könnten, würde dafürsprechen, dass sie bei der Anwendung bei chronischen Lebererkrankungen, wie Fibrose oder Zirrhose, durchaus therapeutisch wirksam sein könnten. Die Daten aus dem parallel in Mannheim durchgeführten Projekt, in dem die Wirkung der ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen in einem Fibrosemodell in der Maus untersucht wurde, zeigen deutlich anti-fibrotische Eigenschaften der Zellen. Auch die Sekretion von immunmodulatorischen Mediatoren, die die Rekrutierung von Immunzellen unterstützen, könnte bei der Therapie chronischer Lebererkrankungen von Nutzen sein. Vor der klinischen Anwendung müsste dies allerdings in weiterführenden Versuchen an Tiermodellen mit chronischen Lebererkrankungen, wie z.B. der nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH), in der sowohl metabolische, inflammatorische und anti-fibrotische Eigenschaften der ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen untersucht werden könnten, gezeigt werden.

## **Zusammenfassung der Arbeit**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. med.

Zellbiologische und biochemische Charakterisierung von humanen ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen der Haut sowie deren Wirkung auf Leberfunktionen nach hepatischer Transplantation in der Maus

eingereicht von: Lysann Tietze

angefertigt am / in: Universität Leipzig  
Universitätsklinikum Leipzig AöR  
Klinik und Poliklinik für Viszeral-, Transplantations-,  
Thorax- und Gefäßchirurgie  
Arbeitsgruppe Angewandte Molekulare Hepatologie

Betreut von: Prof. Dr. rer. nat. Bruno Christ  
Dr. rer. med. Sandra Winkler

November 2017

Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan des Menschen. Sie besitzt eine hohe Regenerationsfähigkeit nach Leberschädigung, die auf der Teilung der Hepatozyten beruht. Im Endstadium akuter oder chronischer Lebererkrankungen, wie z.B. dem akuten Leberversagen nach Pilzvergiftung oder bei Leberzirrhose, ist die Teilungsfähigkeit der Hepatozyten und somit das Regenerationspotential der Leber jedoch stark eingeschränkt, so dass eine Lebertransplantation die einzige Therapieoption ist. Allerdings erhalten ca. 30 % der Patienten auf der Warteliste für die Lebertransplantation keine Spenderleber. Eine Alternative zur Behandlung von akuten und chronischen Lebererkrankungen wären mesenchymale Stammzellen. Sie können aus vielen Geweben z.B. Knochenmark, Fettgewebe, Leber u.a. isoliert werden.

Durch die Sekretion von parakrinen Botenstoffen, wie Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren sowie dem direkten Zell-Zell Kontakt mit dem umliegenden Gewebe wirken mesenchymale Stammzellen immunmodulatorisch, anti-inflammatorisch, anti-apoptotisch und pro-proliferativ. Eine Subpopulation mesenchymaler Stammzellen aus der humanen Haut stellen ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen dar. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen für die Erneuerungsfähigkeit der humanen Haut mitverantwortlich sind und die Regeneration der Hornhaut des Auges positiv beeinflussen.

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Frage, inwieweit ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen auch für die Therapie bei Lebererkrankungen geeignet sein könnten. Dazu wurde ihre hepatozytäre Differenzierungsfähigkeit *in vitro* sowie ihre Wirkung *in vivo* nach hepatischer Applikation getestet. Im Vordergrund standen hierbei die Fragen nach der Unbedenklichkeit der Applikation sowie die Wirkung auf leberspezifische Funktionen in einem xenogenen Transplantationsmodell in der Maus. Analysiert wurden adulte mesenchymale Ausgangsstammzellpräparationen (Parentalstammzellen) der humanen Haut und die daraus selektierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen, die von der Firma RHEACELL GmbH & Co. KG zur Verfügung gestellt wurden. Bei den Parentalstammzellen handelt es sich um eine Mischpopulation, aus denen die ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen selektiert wurden. Die undifferenzierten Parentalstammzellen und ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen wurden nach einem in der Arbeitsgruppe etablierten Protokoll zur hepatozytären Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen behandelt. *In vitro* wurden die Morphologie und Expression von hepatozytenspezifischen Markern, funktionelle Merkmale, wie der Fremdstoffmetabolismus und die Einlagerung von Glykogen, untersucht. Zur Analyse der von undifferenzierten und differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen sezernierten Zytokine wurde eine Sekretomanalyse durchgeführt. *In vivo* wurden in immundefizienten Pfp/Rag2<sup>-/-</sup> Mäusen  $7,5 \times 10^5$  undifferenzierte oder hepatogen differenzierte ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen nach einer 30 %igen Hepatektomie über die Milz injiziert. Der Einfluss der Zellen auf die Leber wurde u.a. anhand der Leberzellschädigung (AST/ALT-Bestimmung im Serum), der Proliferationsrate (Ki67-Immunhistochemie), Lipidakkumulation (Sudan III-Nachweis) und der Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen (IL-1 $\beta$ , IL-6) 2 Tage und 7 Wochen nach der Transplantation analysiert.

Die biochemische und zellbiologische Analyse zusammenfassend, zeigte sich, dass nach dem vorliegenden Protokoll keine der humanen Leber vergleichbare hepatogene Differenzierung der humanen Stammzellen erreicht wurde. Es wurde nur ein marginaler, aber signifikanter Anstieg leberspezifischer funktioneller Merkmale, wie der des Fremdstoffmetabolismus, beobachtet.

Die Expression einiger leberspezifischer Gene nahm auf RNA-Ebene tendenziell, aber nicht signifikant zu. Nach hepatischer Applikation konnten die transplantierten Zellen in der Empfängerleber nicht nachgewiesen werden.

Hervorzuheben ist jedoch, dass nach der Transplantation der differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen keine auffälligen Veränderungen im Wirtslebergewebe nachgewiesen wurden. Es zeigten sich im Beobachtungszeitraum keine Nekrosen, Tumore oder eine Zunahme fibrotischer Veränderungen. Transaminasen waren nicht erhöht. Auch die Expression der untersuchten Gene war nicht verändert.

Nach den vorliegenden Ergebnissen kann man davon ausgehen, dass die hier untersuchten Zellen kein ausgeprägtes hepatogenes Differenzierungspotential aufwiesen. Auch führte die hepatische Applikation nicht zur Integration und Proliferation der Zellen ins gesunde Wirtslebergewebe, so dass die Zellen wahrscheinlich keinen nennenswerten funktionellen Gewebeersatz liefern können. Allerdings zeigten sie auch keine leberschädigende Wirkung. Daher bleibt zu klären, ob die Zellen, beruhend auf ihrer parakrinen Wirkung, zur Regeneration der erkrankten Leber beitragen. Erste Hinweise darauf wurden in einem parallelen Projekt erbracht. Hier verbesserten die ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen die Fibrose in einem Zirrhosemodell in der Maus.

**Literaturverzeichnis**

1. Alison, M.R., Islam, S. & Lim, S. 2009. Stem cells in liver regeneration, fibrosis and cancer: the good, the bad and the ugly. *The Journal of pathology* **217**, 282–298.
2. Allard, J., Li, K., Lopez, X.M., Blanchard, S., Barbot, P., Rorive, S., Decaestecker, C., Pochet, R., Bohl, D., Lepore, A.C., Salmon, I. & Nicaise, C. 2014. Immunohistochemical toolkit for tracking and quantifying xenotransplanted human stem cells. *Regenerative medicine* **9**, 437–452.
3. Amorin, B., Alegretti, A.P., Valim, V., Pezzi, A., Laureano, A.M., da Silva, M.A.L., Wieck, A. & Silla, L. 2014. Mesenchymal stem cell therapy and acute graft-versus-host disease. A review. *Human cell* **27**, 137–150.
4. Armstrong, L.C. & Bornstein, P. 2003. Thrombospondins 1 and 2 function as inhibitors of angiogenesis. *Matrix Biology* **22**, 63–71.
5. Aurich, H., Sgodda, M., Kaltwasser, P., Vetter, M., Weise, A., Liehr, T., Brulport, M., Hengstler, J.G., Dollinger, M.M., Fleig, W.E. & Christ, B. 2009. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. *Gut* **58**, 570–581.
6. Aurich, I., Mueller, L.P., Aurich, H., Luetzkendorf, J., Tisljar, K., Dollinger, M.M., Schormann, W., Walldorf, J., Hengstler, J.G., Fleig, W.E. & Christ, B. 2007. Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers. *Gut* **56**, 405–415.
7. Baertschiger, R.M., Serre-Beinier, V., Morel, P., Bosco, D., Peyrou, M., Clément, S., Sgroi, A., Kaelin, A., Buhler, L.H. & Gonelle-Gispert, C. 2009. Fibrogenic potential of human multipotent mesenchymal stromal cells in injured liver. *PLoS ONE* **4**, e6657.
8. Bajou, K., Peng, H., Laug, W.E., Maillard, C., Noel, A., Foidart, J.M., Martial, J.A. & DeClerck, Y.A. 2008. Plasminogen activator inhibitor-1 protects endothelial cells from FasL-mediated apoptosis. *Cancer cell* **14**, 324–334.
9. Banas, A., Teratani, T., Yamamoto, Y., Tokuhara, M., Takeshita, F., Osaki, M., Kato, T., Okochi, H. & Ochiya, T. 2009. Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure. *Journal of gastroenterology and hepatology* **24**, 70–77.
10. Banas, A., Teratani, T., Yamamoto, Y., Tokuhara, M., Takeshita, F., Quinn, G., Okochi, H. & Ochiya, T. 2007. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **46**, 219–228.
11. Baumhoer, D., Steinbrück, I. & Götz, W. 2003. Histologie. Kurzlehrbuch zum Gegenstandskatalog ; [neuer GK]. Urban & Fischer, München.
12. Beringer, A., Noack, M. & Miossec, P. 2016. IL-17 in Chronic Inflammation. From Discovery to Targeting. *Trends in molecular medicine* **22**, 230–241.
13. Bernardo, M.E. & Fibbe, W.E. 2013. Mesenchymal stromal cells. Sensors and switchers of inflammation. *Cell stem cell* **13**, 392–402.
14. Bernhagen, J., Krohn, R., Lue, H., Gregory, J.L., Zernecke, A., Koenen, R.R., Dewor, M., Georgiev, I., Schober, A., Leng, L., Kooistra, T., Fingerle-Rowson, G., Ghezzi, P., Kleemann, R., McColl, S.R. & Bucala, R. *et al.* 2007. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nature medicine* **13**, 587–596.

15. Bhatia, S.N., Underhill, G.H., Zaret, K.S. & Fox, I.J. 2014. Cell and tissue engineering for liver disease. *Science translational medicine* **6**, 245sr2.
16. Bishayee, A. 2014. The role of inflammation and liver cancer. *Advances in experimental medicine and biology* **816**, 401–435.
17. Blier, P.R., Griffith, A.J., Craft, J. & Hardin, J.A. 1993. Binding of Ku protein to DNA. Measurement of affinity for ends and demonstration of binding to nicks. *The Journal of biological chemistry* **268**, 7594–7601.
18. Block, G.J., Ohkouchi, S., Fung, F., Frenkel, J., Gregory, C., Pochampally, R., DiMattia, G., Sullivan, D.E. & Prockop, D.J. 2009. Multipotent stromal cells are activated to reduce apoptosis in part by upregulation and secretion of stanniocalcin-1. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **27**, 670–681.
19. Boleslawski, E., Vibert, E., Pruvot, F.-R., Le Treut, Y.-P., Scatton, O., Laurent, C., Mabrut, J.-Y., Régimbeau, J.-M., Adham, M., Cosse, C. & Farges, O. 2014. Relevance of postoperative peak transaminase after elective hepatectomy. *Annals of surgery* **260**, 815-20; discussion 820-1.
20. Bootcov, M.R., Bauskin, A.R., Valenzuela, S.M., Moore, A.G., Bansal, M., He, X.Y., Zhang, H.P., Donnellan, M., Mahler, S., Pryor, K., Walsh, B.J., Nicholson, R.C., Fairlie, W.D., Por, S.B., Robbins, J.M. & Breit, S.N. 1997. MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-beta superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 11514–11519.
21. Borst, P. & Elferink, R.O. 2002. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annual review of biochemistry* **71**, 537–592.
22. Boulton, S.J. & Jackson, S.P. 1998. Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing. *The EMBO journal* **17**, 1819–1828.
23. Brew, K., Dinakarbandian, D. & Nagase, H. 2000. Tissue inhibitors of metalloproteinases. Evolution, structure and function. *Biochimica et biophysica acta* **1477**, 267–283.
24. Brückner, S., Tautenhahn, H.-M., Winkler, S., Stock, P., Dollinger, M. & Christ, B. 2014. A fat option for the pig. Hepatocytic differentiated mesenchymal stem cells for translational research. *Experimental Cell Research* **321**, 267–275.
25. Bunnell, B.A., Betancourt, A.M. & Sullivan, D.E. 2010. New concepts on the immune modulation mediated by mesenchymal stem cells. *Stem cell research & therapy* **1**, 34.
26. Butler, S.L., Dong, H., Cardona, D., Jia, M., Zheng, R., Zhu, H., Crawford, J.M. & Liu, C. 2008. The antigen for Hep Par 1 antibody is the urea cycle enzyme carbamoyl phosphate synthetase 1. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **88**, 78–88.
27. Carpino, G., Morini, S., Ginanni Corradini, S., Franchitto, A., Merli, M., Siciliano, M., Gentili, F., Onetti Muda, A., Berloco, P., Rossi, M., Attili, A.F. & Gaudio, E. 2005. Alpha-SMA expression in hepatic stellate cells and quantitative analysis of hepatic fibrosis in cirrhosis and in recurrent chronic hepatitis after liver transplantation. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* **37**, 349–356.
28. Castro-Manrreza, M.E. & Montesinos, J.J. 2015. Immunoregulation by mesenchymal stem cells: biological aspects and clinical applications. *Journal of immunology research* **2015**, 394917.



29. Chaudhary, P.M. & Roninson, I.B. 1991. Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell* **66**, 85–94.
30. Chen, K.G., Szakács, G., Annereau, J.-P., Rouzaud, F., Liang, X.-J., Valencia, J.C., Naginevi, C.N., Hooks, J.J., Hearing, V.J. & Gottesman, M.M. 2005. Principal expression of two mRNA isoforms (ABCB 5alpha and ABCB 5beta ) of the ATP-binding cassette transporter gene ABCB 5 in melanoma cells and melanocytes. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* **18**, 102–112.
31. Chen, K.G., Valencia, J.C., Gillet, J.-P., Hearing, V.J. & Gottesman, M.M. 2009. Involvement of ABC transporters in melanogenesis and the development of multi-drug resistance of melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research* **22**, 740–749.
32. Cheng, J.H., She, H., Han, Y.-P., Wang, J., Xiong, S., Asahina, K. & Tsukamoto, H. 2008. Wnt antagonism inhibits hepatic stellate cell activation and liver fibrosis. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **294**, G39–49.
33. Christ, B., Bruckner, S. & Winkler, S. 2015. The Therapeutic Promise of Mesenchymal Stem Cells for Liver Restoration. *Trends in molecular medicine* **21**, 673–686.
34. Christ, B. & Dollinger, M.M. 2011. The generation of hepatocytes from mesenchymal stem cells and engraftment into the liver. *Current opinion in organ transplantation* **16**, 69–75.
35. Court, F.G., Wemyss-Holden, S.A., Dennison, A.R. & Maddern, G.J. 2002. The mystery of liver regeneration. *The British journal of surgery* **89**, 1089–1095.
36. Dean, M. & Allikmets, R. 2001. Complete characterization of the human ABC gene family. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **33**, 475–479.
37. Di Bonzo, L.V., Ferrero, I., Cravanzola, C., Mareschi, K., Rustichell, D., Novo, E., Sanavio, F., Cannito, S., Zamara, E., Bertero, M., Davit, A., Francica, S., Novelli, F., Colombatto, S., Fagioli, F. & Parola, M. 2008. Human mesenchymal stem cells as a two-edged sword in hepatic regenerative medicine: engraftment and hepatocyte differentiation versus profibrogenic potential. *Gut* **57**, 223–231.
38. Di Domenico, S., Santori, G., Balbis, E., Traverso, N., Gentile, R., Bocca, B., Gelli, M., Andorno, E., Cottalasso, D. & Valente, U. 2010. Biochemical and morphologic effects after extended liver resection in rats. Preliminary results. *Transplantation proceedings* **42**, 1061–1065.
39. Dimova, E.Y. & Kietzmann, T. 2008. Metabolic, hormonal and environmental regulation of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression. Lessons from the liver. *Thromb Haemost.*
40. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. & Horwitz, E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–317.
41. Dutta, P., Hoyer, F.F., Grigoryeva, L.S., Sager, H.B., Leuschner, F., Courties, G., Borodovsky, A., Novobrantseva, T., Ruda, V.M., Fitzgerald, K., Iwamoto, Y., Wojtkiewicz, G., Sun, Y., Da Silva, N., Libby, P. & Anderson, D.G. *et al.* 2015. Macrophages retain hematopoietic stem cells in the spleen via VCAM-1. *The Journal of experimental medicine* **212**, 497–512.
42. Ezquer, F., Bahamonde, J., Huang, Y.-L. & Ezquer, M. 2017. Administration of multipotent mesenchymal stromal cells restores liver regeneration and improves liver function in obese mice with hepatic steatosis after partial hepatectomy. *Stem cell research & therapy* **8**, 20.

43. Farrell, G.C. 2004. Probing Prometheus. Fat fueling the fire? *Hepatology (Baltimore, Md.)* **40**, 1252–1255.
44. Fausto, N. 2004. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **39**, 1477–1487.
45. Fausto, N., Campbell, J.S. & Riehle, K.J. 2006. Liver regeneration. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **43**, S45–53.
46. Fox, I.J., Chowdhury, J.R., Kaufman, S.S., Goertzen, T.C., Chowdhury, N.R., Warkentin, P.I., Dorko, K., Sauter, B.V. & Strom, S.C. 1998. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *The New England journal of medicine* **338**, 1422–1426.
47. Fox, I.J. & Roy-Chowdhury, J. 2004. Hepatocyte transplantation. *Journal of hepatology* **40**, 878–886.
48. Frank, M.H. & Frank, N.Y. 2015. Restoring the cornea from limbal stem cells. *Regenerative medicine* **10**, 1–4.
49. Frank, N.Y. & Frank, M.H. 2009. ABCB5 gene amplification in human leukemia cells. *Leukemia Research* **33**, 1303–1305.
50. Frank, N.Y., Pendse, S.S., Lapchak, P.H., Margaryan, A., Shlain, D., Doeing, C., Sayegh, M.H. & Frank, M.H. 2003. Regulation of progenitor cell fusion by ABCB5 P-glycoprotein, a novel human ATP-binding cassette transporter. *The Journal of biological chemistry* **278**, 47156–47165.
51. Fregonese, L. & Stolk, J. 2008. Hereditary alpha-1-antitrypsin deficiency and its clinical consequences. *Orphanet journal of rare diseases* **3**, 16.
52. Friedenstein, A.J., Gorskaja, J.F. & Kulagina, N.N. 1976. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental hematology* **4**, 267–274.
53. Friedman, S.L. 2008. Hepatic fibrosis -- overview. *Toxicology* **254**, 120–129.
54. Gebhardt, R. & Hovhannisyan, A. 2010. Organ patterning in the adult stage: the role of Wnt/beta-catenin signaling in liver zonation and beyond. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **239**, 45–55.
55. Giannandrea, M. & Parks, W.C. 2014. Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis. *Disease models & mechanisms* **7**, 193–203.
56. Gougelet, A. & Colnot, S. 2012. A Complex Interplay between Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalling and the Cell Cycle in the Adult Liver. *International journal of hepatology* **2012**, 816125.
57. Guengerich, F.P. 2001. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chemical research in toxicology* **14**, 611–650.
58. Hamano, M., Ezaki, H., Kiso, S., Furuta, K., Egawa, M., Kizu, T., Chatani, N., Kamada, Y., Yoshida, Y. & Takehara, T. 2014. Lipid overloading during liver regeneration causes delayed hepatocyte DNA replication by increasing ER stress in mice with simple hepatic steatosis. *Journal of gastroenterology* **49**, 305–316.
59. Hao, N.-B., Li, C.-Z., Lü, M.-H., Tang, B., Wang, S.-M., Wu, Y.-Y., Liang, G.-P. & Yang, S.-M. 2015. SDF-1/CXCR4 Axis Promotes MSCs to Repair Liver Injury Partially through Trans-Differentiation and Fusion with Hepatocytes. *Stem cells international* **2015**, 960387.
60. (eds)Hartwig, V.A., Dewidar, B., Kluth, A., Tappenbeck, N., Dropmann, A., Meyer, C., Meindl-Beinker, N.M. & Dooley, S. 2017. ABCB5+ mesenchymal stem cell

- transplantation in a chronic liver disease mouse model. 33. Annual Meeting of the German Association for the Study of the Liver (GASL).
61. Heissig, B., Dhahri, D., Eiamboonsert, S., Salama, Y., Shimazu, H., Munakata, S. & Hattori, K. 2015. Role of mesenchymal stem cell-derived fibrinolytic factor in tissue regeneration and cancer progression. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **72**, 4759–4770.
62. Hengstler, J.G., Brulport, M., Schormann, W., Bauer, A., Hermes, M., Nussler, A.K., Fandrich, F., Ruhnke, M., Ungefroren, H., Griffin, L., Bockamp, E., Oesch, F. & Mach, M.-A. von 2005. Generation of human hepatocytes by stem cell technology: definition of the hepatocyte. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* **1**, 61–74.
63. Hermann, W. 2012. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Morbus Wilson.
64. Hogaboam, C.M., Bone-Larson, C.L., Steinhauser, M.L., Lukacs, N.W., Colletti, L.M., Simpson, K.J., Strieter, R.M. & Kunkel, S.L. 1999. Novel CXCR2-dependent liver regenerative qualities of ELR-containing CXC chemokines. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **13**, 1565–1574.
65. Hsiao, S.T.-F., Asgari, A., Lokmic, Z., Sinclair, R., Dusting, G.J., Lim, S.Y. & Dilley, R.J. 2012. Comparative analysis of paracrine factor expression in human adult mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose, and dermal tissue. *Stem cells and development* **21**, 2189–2203.
66. Hsu, M.-J., Prigent, J., Dollet, P.-E., Ravau, J., Larbanoix, L., van Simaey, G., Bol, A., Grégoire, V., Goldman, S., Deblandre, G., Najimi, M., Sokal, E.M. & Lombard, C.A. 2017. Long-Term In Vivo Monitoring of Adult-Derived Human Liver Stem/Progenitor Cells by Bioluminescence Imaging, Positron Emission Tomography, and Contrast-Enhanced Computed Tomography. *Stem cells and development* **26**, 986–1002.
67. Huang, J. & Rudnick, D.A. 2014. Elucidating the metabolic regulation of liver regeneration. *The American journal of pathology* **184**, 309–321.
68. Jia, X.-H., Feng, G.-W., Wang, Z.-L., Du, Y., Shen, C., Hui, H., Peng, D., Li, Z.-J., Kong, D.-L. & Tian, J. 2016. Activation of mesenchymal stem cells by macrophages promotes tumor progression through immune suppressive effects. *Oncotarget* **7**, 20934–20944.
69. Jungermann, K. 1995. Zonation of metabolism and gene expression in liver. *Histochemistry and cell biology* **103**, 81–91.
70. Junqueira, L.C. & Carneiro, J. 1996. Histologie. Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. Unter Berücksichtigung der Histophysiologie. Springer Berlin Heidelberg; Imprint: Springer, Berlin, Heidelberg.
71. Kamiya, A., Kinoshita, T. & Miyajima, A. 2001. Oncostatin M and hepatocyte growth factor induce hepatic maturation via distinct signaling pathways. *FEBS Letters* **492**, 90–94.
72. Karin, M. & Clevers, H. 2016. Reparative inflammation takes charge of tissue regeneration. *Nature* **529**, 307–315.
73. Kim, M.-D., Kim, S.-S., Cha, H.-Y., Jang, S.-H., Chang, D.-Y., Kim, W., Suh-Kim, H. & Lee, J.-H. 2014. Therapeutic effect of hepatocyte growth factor-secreting mesenchymal stem cells in a rat model of liver fibrosis. *Experimental & molecular medicine* **46**, e110.

74. Kim, N. & Cho, S.-G. 2016. Overcoming immunoregulatory plasticity of mesenchymal stem cells for accelerated clinical applications. *International journal of hematology* **103**, 129–137.
75. Kim, S., Meier, B., Schatton, T., Wilson, B., Zhan, Q., Loh, Y., Daley, G., Sayegh, M., Ziouta, Y., Ganss, C., Scharffetter-Kochanek, K., Murphy, G., Frank, M.H. & Frank, N.Y. 2010. Identification of human ABCB5+ dermal progenitor cells with multipotent differentiation plasticity. Abstracts of the Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology. May 5-8, 2010. Atlanta, Georgia, USA. *The Journal of investigative dermatology* **130 Suppl 1**, S1-S149.
76. Kim, T.H., Mars, W.M., Stolz, D.B. & Michalopoulos, G.K. 2000. Expression and activation of pro-MMP-2 and pro-MMP-9 during rat liver regeneration. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **31**, 75–82.
77. Klemann, C., Wagner, L., Stephan, M. & Hörsten, S. von 2016. Cut to the chase. A review of CD26/dipeptidyl peptidase-4's (DPP4) entanglement in the immune system. *Clinical and experimental immunology* **185**, 1–21.
78. Kobolak, J., Dinnyes, A., Memic, A., Khademhosseini, A. & Mobasheri, A. 2016. Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. *Methods (San Diego, Calif.)* **99**, 62–68.
79. Kohjima, M., Tsai, T.-H., Tackett, B.C., Thevananther, S., Li, L., Chang, B.H.-J. & Chan, L. 2013. Delayed liver regeneration after partial hepatectomy in adipose differentiation related protein-null mice. *Journal of hepatology* **59**, 1246–1254.
80. Konala, V.B.R., Mamidi, M.K., Bhonde, R., Das, A.K., Pochampally, R. & Pal, R. 2016. The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome. A new paradigm for cell-free regeneration. *Cytotherapy* **18**, 13–24.
81. Koolman, J. & Röhm, K.-H. 2009. Taschenatlas Biochemie des Menschen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
82. Koyama, Y. & Brenner, D.A. 2017. Liver inflammation and fibrosis. *The Journal of clinical investigation* **127**, 55–64.
83. Ksander, B.R., Kolovou, P.E., Wilson, B.J., Saab, K.R., Guo, Q., Ma, J., McGuire, S.P., Gregory, M.S., Vincent, W.J.B., Perez, V.L., Cruz-Guilloty, F., Kao, W.W.Y., Call, M.K., Tucker, B.A., Zhan, Q. & Murphy, G.F. *et al.* 2014. ABCB5 is a limbal stem cell gene required for corneal development and repair. *Nature* **511**, 353–357.
84. Kupcova Skalnikova, H. 2013. Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome. *Biochimie* **95**, 2196–2211.
85. Lee, C.G., Da Silva, C.A., Dela Cruz, C.S., Ahangari, F., Ma, B., Kang, M.-J., He, C.-H., Takyar, S. & Elias, J.A. 2011. Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury. *Annual review of physiology* **73**, 479–501.
86. Lee, K.-D., Kuo, T.K.-C., Whang-Peng, J., Chung, Y.-F., Lin, C.-T., Chou, S.-H., Chen, J.-R., Chen, Y.-P. & Lee, O.K.-S. 2004. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **40**, 1275–1284.
87. Leng, L., Metz, C.N., Fang, Y., Xu, J., Donnelly, S., Baugh, J., Delohery, T., Chen, Y., Mitchell, R.A. & Bucala, R. 2003. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *The Journal of experimental medicine* **197**, 1467–1476.
88. Lindoso, R.S., Collino, F. & Camussi, G. 2015. Extracellular vesicles derived from renal cancer stem cells induce a pro-tumorigenic phenotype in mesenchymal stromal cells. *Oncotarget* **6**, 7959–7969.

89. (eds)Löffler, G., Heinrich, P.C. & Petrides, P.E. 2007. Biochemie und Pathobiochemie, Berlin, Heidelberg. Springer Medizin Verlag Heidelberg.
90. Lüllmann-Rauch, R. & Asan, E. 2015. Taschenbuch Histologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
91. Marra, F. & Tacke, F. 2014. Roles for chemokines in liver disease. *Gastroenterology* **147**, 577-594.e1.
92. Mathew, E., Brannon, A.L., Del Vecchio, A., Garcia, P.E., Penny, M.K., Kane, K.T., Vinta, A., Buckanovich, R.J. & Di Magliano, M.P. 2016. Mesenchymal Stem Cells Promote Pancreatic Tumor Growth by Inducing Alternative Polarization of Macrophages. *Neoplasia (New York, N.Y.)* **18**, 142–151.
93. Meier, B., Ziouta, Y., Basu, A., Sindrilaru, A., Hainzl, A., Maity, P., Wlaschek, M., Ganss, C., Frank, M.H., Frank, N.Y. & Scharffetter-Kochanek, K. 2010. Progressive decrease in number and change in niche preference of the ABCB5+ mesenchymal stem cell. *37th Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF)*.
94. Meier, R.P.H., Müller, Y.D., Morel, P., Gonelle-Gispert, C. & Bühler, L.H. 2013. Transplantation of mesenchymal stem cells for the treatment of liver diseases, is there enough evidence? *Stem cell research* **11**, 1348–1364.
95. Michalopoulos, G.K. 2007. Liver regeneration. *Journal of cellular physiology* **213**, 286–300.
96. Michalopoulos, G.K. 2010. Liver regeneration after partial hepatectomy. Critical analysis of mechanistic dilemmas. *The American journal of pathology* **176**, 2–13.
97. Miyajima, A., Kinoshita, T., Tanaka, M., Kamiya, A., Mukouyama, Y. & Hara, T. 2000. Role of Oncostatin M in hematopoiesis and liver development. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **11**, 177–183.
98. (eds)Mulisch, M. & Welsch, U. 2015. Romeis Mikroskopische Technik, Berlin, Heidelberg. Springer Spektrum.
99. Murphy, M.B., Moncivais, K. & Caplan, A.I. 2013. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Experimental & molecular medicine* **45**, e54.
100. Nakanishi, C., Nagaya, N., Ohnishi, S., Yamahara, K., Takabatake, S., Konno, T., Hayashi, K., Kawashiri, M.-a., Tsubokawa, T. & Yamagishi, M. 2011. Gene and Protein Expression Analysis of Mesenchymal Stem Cells Derived From Rat Adipose Tissue and Bone Marrow. *Circ J* **75**, 2260–2268.
101. Newberry, E.P., Kennedy, S.M., Xie, Y., Luo, J., Stanley, S.E., Semenkovich, C.F., Crooke, R.M., Graham, M.J. & Davidson, N.O. 2008. Altered hepatic triglyceride content after partial hepatectomy without impaired liver regeneration in multiple murine genetic models. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **48**, 1097–1105.
102. Nicolas, C.T., Wang, Y. & Nyberg, S.L. 2016. Cell therapy in chronic liver disease. *Current Opinion in Gastroenterology*, 1.
103. Olthof, P.B., Huiskens, J., Schulte, N.R., Wicherts, D.A., Besselink, M.G., Busch, O.R., Heger, M. & van Gulik, T.M. 2016. Postoperative peak transaminases correlate with morbidity and mortality after liver resection. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* **18**, 915–921.
104. Owen, A. & Newsome, P.N. 2015. Mesenchymal stromal cell therapy in liver disease. Opportunities and lessons to be learnt? *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **309**, G791-800.

105. Pan, S.-C., Wu, L.-W., Chen, C.-L., Shieh, S.-J. & Chiu, H.-Y. 2012. Angiogenin expression in burn blister fluid: implications for its role in burn wound neovascularization. *Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* **20**, 731–739.
106. Presta, M., Camozzi, M., Salvatori, G. & Rusnati, M. 2007. Role of the soluble pattern recognition receptor PTX3 in vascular biology. *Journal of cellular and molecular medicine* **11**, 723–738.
107. Prockop, D.J. & Youn Oh, J. 2012. Mesenchymal Stem/Stromal Cells (MSCs). Role as Guardians of Inflammation. *Molecular Therapy* **20**, 14–20.
108. Roth, K.J. & Copple, B.L. 2015. Role of Hypoxia-Inducible Factors in the Development of Liver Fibrosis. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology* **1**, 589–597.
109. Salame, E., Goldstein, M.J., Kinkhabwala, M., Kapur, S., Finn, R., Lobritto, S., Brown, R. & Emond, J.C. 2002. Analysis of Donor Risk in Living-Donor Hepatectomy. The Impact of Resection Type on Clinical Outcome. *Am J Transplant* **2**, 780–788.
110. Schatton, T., Yang, J., Kleffel, S., Uehara, M., Barthel, S.R., Schlapbach, C., Zhan, Q., Dudeney, S., Mueller, H., Lee, N., Vries, J.C. de, Meier, B., Vander Beken, S., Kluth, M.A., Ganss, C. & Sharpe, A.H. *et al.* 2015. ABCB5 Identifies Immunoregulatory Dermal Cells. *Cell reports* **12**, 1564–1574.
111. Sgodda, M., Aurich, H., Kleist, S., Aurich, I., Konig, S., Dollinger, M.M., Fleig, W.E. & Christ, B. 2007. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from rat peritoneal adipose tissue in vitro and in vivo. *Experimental Cell Research* **313**, 2875–2886.
112. Shteyer, E., Liao, Y., Muglia, L.J., Hruz, P.W. & Rudnick, D.A. 2004. Disruption of hepatic adipogenesis is associated with impaired liver regeneration in mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **40**, 1322–1332.
113. Singer, N.G. & Caplan, A.I. 2011. Mesenchymal stem cells. Mechanisms of inflammation. *Annual review of pathology* **6**, 457–478.
114. (eds) Sobotta, J. & Welsch, U. 2003. Lehrbuch Histologie. Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie ; mit 21 Tabellen, München. Elsevier Urban & Fischer.
115. Sotiropoulou, P.A., Perez, S.A., Gritzapis, A.D., Baxevas, C.N. & Papamichail, M. 2006. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **24**, 74–85.
116. Squillaro, T., Peluso, G. & Galderisi, U. 2016. Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells. An Update. *Cell transplantation* **25**, 829–848.
117. Stock, P., Bruckner, S., Ebensing, S., Hempel, M., Dollinger, M.M. & Christ, B. 2010. The generation of hepatocytes from mesenchymal stem cells and engraftment into murine liver. *Nature protocols* **5**, 617–627.
118. Stoltz, J.-F., Isla, N. de, Li, Y.P., Bensoussan, D., Zhang, L., Huselstein, C., Chen, Y., Decot, V., Magdalou, J., Li, N., Reppel, L. & He, Y. 2015. Stem Cells and Regenerative Medicine: Myth or Reality of the 21st Century. *Stem cells international* **2015**, 734731.
119. Sun, Z., Li, T., Wen, H., Wang, H., Ji, W. & Ma, Y. 2015. Immunological effect induced by mesenchymal stem cells in a rat liver transplantation model. *Experimental and therapeutic medicine* **10**, 401–406.
120. Sydor, S., Gu, Y., Schlattjan, M., Bechmann, L.P., Rauen, U., Best, J., Paul, A., Baba, H.A., Sowa, J.-P., Gerken, G. & Canbay, A. 2013. Steatosis does not impair

- liver regeneration after partial hepatectomy. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **93**, 20–30.
121. Sze, S.K., Kleijn, D.P.V. de, Lai, R.C., Khia Way Tan, E., Zhao, H., Yeo, K.S., Low, T.Y., Lian, Q., Lee, C.N., Mitchell, W., El Oakley, R.M. & Lim, S.-K. 2007. Elucidating the secretion proteome of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **6**, 1680–1689.
122. Tamama, K., Kawasaki, H., Kerpedjieva, S.S., Guan, J., Ganju, R.K. & Sen, C.K. 2011. Differential roles of hypoxia inducible factor subunits in multipotential stromal cells under hypoxic condition. *Journal of cellular biochemistry* **112**, 804–817.
123. Tautenhahn, H.-M., Brückner, S., Baumann, S., Winkler, S., Otto, W., Bergen, M. von, Bartels, M. & Christ, B. 2016. Attenuation of Postoperative Acute Liver Failure by Mesenchymal Stem Cell Treatment Due to Metabolic Implications. *Annals of surgery* **263**, 546–556.
124. Tautenhahn, H.-M., Brückner, S., Uder, C., Erler, S., Hempel, M., Bergen, M. von, Brach, J., Winkler, S., Pankow, F., Gittel, C., Baunack, M., Lange, U., Broschewitz, J., Dollinger, M., Bartels, M. & Pietsch, U. *et al.* 2017. Mesenchymal stem cells correct haemodynamic dysfunction associated with liver injury after extended resection in a pig model. *Scientific reports* **7**, 2617.
125. Uccelli, A., Moretta, L. & Pistoia, V. 2008. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature reviews. Immunology* **8**, 726–736.
126. Ulvik, R.J. 2015. The liver in haemochromatosis. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)* **31**, 219–224.
127. van Poll, D., Parekkadan, B., Cho, C.H., Berthiaume, F., Nahmias, Y., Tilles, A.W. & Yarmush, M.L. 2008. Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **47**, 1634–1643.
128. Vander Beken, S., Jiang, D., Qi, Y., Vries, J. de, Kluth, A., Ziouta, Y., Ganss, C., Wlaschek, M. & Scharffetter-Kochanek, K. 2013. Tissue Regeneration and Wound Healing. 1454 Human dermis-derived ABCB5-positive mesenchymal stem cells accelerate mouse skin fullthickness excisional wound healing in part by the secretion of interleukin-1 receptor antagonist. *Journal of Investigative Dermatology*, S247.
129. Vilahur, G. & Badimon, L. 2015. Biological actions of pentraxins. *Vascular pharmacology* **73**, 38–44.
130. Vries, J.C. de, Herold, B., Vander Beken, S., Meier, B., Jiang, D., Kluth, A., Ganss, C., Frank, N., Frank, M. & Scharffetter-Kochanek, K. 2016. Wound Healing and Tissue Remodelling. 577 Ageing in the dermal perivascular niche: ABCB5+ MSCs depend on osteopontin. *Journal of Investigative Dermatology*, S259.
131. Walldorf, J., Hillebrand, C., Aurich, H., Stock, P., Hempel, M., Ebensing, S., Fleig, W.E., Seufferlein, T., Dollinger, M.M. & Christ, B. 2010. Propranolol impairs liver regeneration after partial hepatectomy in C57Bl/6-mice by transient attenuation of hepatic lipid accumulation and increased apoptosis. *Scandinavian journal of gastroenterology* **45**, 468–476.
132. Wang, H., Zhao, T., Xu, F., Li, Y., Wu, M., Zhu, D., Cong, X. & Liu, Y. 2014. How important is differentiation in the therapeutic effect of mesenchymal stromal cells in liver disease? *Cytotherapy* **16**, 309–318.
133. Wilson, B.J., Schatton, T., Zhan, Q., Gasser, M., Ma, J., Saab, K.R., Schanche, R., Waaga-Gasser, A.-M., Gold, J.S., Huang, Q., Murphy, G.F., Frank, M.H. & Frank,

- N.Y. 2011. ABCB5 Identifies a Therapy-Refractory Tumor Cell Population in Colorectal Cancer Patients. *Cancer Research* **71**, 5307–5316.
134. Winkler, S., Hempel, M., Brückner, S., Mallek, F., Weise, A., Liehr, T., Tautenhahn, H.-M., Bartels, M. & Christ, B. 2015. Mouse white adipose tissue-derived mesenchymal stem cells gain pericentral and periportal hepatocyte features after differentiation in vitro , which are preserved in vivo after hepatic transplantation. *Acta Physiol* **215**, 89–104.
135. Winkler, S., Hempel, M., Brückner, S., Tautenhahn, H.-M., Kaufmann, R. & Christ, B. 2016. Identification of Pathways in Liver Repair Potentially Targeted by Secretory Proteins from Human Mesenchymal Stem Cells. *International journal of molecular sciences* **17**.
136. Wolf, E., Lahm, H., Wu, M., Wanke, R. & Hoeflich, A. 2000. Effects of IGFBP-2 overexpression in vitro and in vivo. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* **14**, 572–578.
137. Wong, V.W., Levi, B., Rajadas, J., Longaker, M.T. & Gurtner, G.C. 2012. Stem cell niches for skin regeneration. *International journal of biomaterials* **2012**, 926059.
138. Yamada, K., Uchiyama, A., Uehara, A., Perera, B., Ogino, S., Yokoyama, Y., Takeuchi, Y., Udey, M.C., Ishikawa, O. & Motegi, S.-I. 2016. MFG-E8 Drives Melanoma Growth by Stimulating Mesenchymal Stromal Cell-Induced Angiogenesis and M2 Polarization of Tumor-Associated Macrophages. *Cancer Research* **76**, 4283–4292.
139. Yin, L., Zhu, Y., Yang, J., Ni, Y., Zhou, Z., Chen, Y. & Wen, L. 2015. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiated into hepatocyte-like cells in vivo and in vitro. *Molecular medicine reports* **11**, 1722–1732.
140. Yuki, H., Ohmura, T., Kawasaki, H., Yajima, T. & Saito, K. 1981. Clinical analysis of urea nitrogen. Chemical structure of the colored reaction product of urea with diacetylmonoxime and thiosemicarbazide. *Chem. Pharm. Bull.* **29**, 1096–1100.
141. Zenobia, C. & Hajishengallis, G. 2015. Basic biology and role of interleukin-17 in immunity and inflammation. *Periodontology 2000* **69**, 142–159.
142. Zhang, W., Ge, W., Li, C., You, S., Liao, L., Han, Q., Deng, W. & Zhao, R.C.H. 2004. Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem cells and development* **13**, 263–271.



## Anlagen

Anlage 1: Name, Alternativname und Entrez Gene ID des *Human XL Cytokine Arrays*.

Name	Alternativname	Entrez Gene ID
Adiponectin	Acrp30	9370
Aggrecan	Aggrecan 1	176
Angiogenin	-	283
Angiopoietin-1	Ang-1, ANGPT1	284
Angiopoietin-2	Ang-2, ANGPT2	285
BAFF	BLyS, TNFSF13B	10673
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>	627
Complement Component C5/C5a	C5/C5a	727
CD14	-	929
CD30	TNFRSF8	943
CD40 ligand	CD40L, TNFSF5, CD154, TRAP	959
Chitinase 3-like 1	CHI3L1, YKL-40	1116
Complement Factor D	Adipsin, CFD	1675
C-Reactive Protein	CRP	1401
Cripto-1	<i>teratocarcinoma-derived growth factor</i>	6997
Cystatin C	CST3, ARMD11	1471
Dkk-1	Dickkopf-1	22943
DPP4	CD26, DPP4, <i>dipeptidyl-peptidase IV</i>	1803
EGF	<i>epidermal growth factor</i>	1950
EMMPRIN	CD147, Basigin	682
ENA-78	CXCL5	6374
Endoglin	CD105, ENG	2022
Fas Ligand	TNFSF6, CD178, CD95L	356
FGF basic	FGF-2	2247
FGF-7	KGF	2252
FGF-19	-	9965
Flt-3 Ligand	FLT3LG	2323
G-CSF	CSF3	1440
GDF-15	MIC-1	9518
GM-CSF	CSF2	1437

GRO- $\alpha$	CXCL1, MSGA- $\alpha$	2919
Growth Hormone	GH, Somatotropin	2688
HGF	<i>scatter factor</i> , SF	3082
ICAM-1	CD54	3383
IFN- $\gamma$	IFNG	3458
IGFBP-2	-	3485
IGFBP-3	-	3486
Interleukin-1 $\alpha$	IL-1F1	3552
Interleukin-1 $\beta$	IL-1F2	3553
Interleukin-1ra	IL-1F3	3557
Interleukin-2	-	3558
Interleukin-3	-	3562
Interleukin-4	-	3565
Interleukin-5	-	3567
Interleukin-6	-	3569
Interleukin-8	CXCL8	3576
Interleukin-10	-	3586
Interleukin-11	-	3589
Interleukin-12 p70	-	3593
Interleukin-13	-	3596
Interleukin-15	-	3600
Interleukin-16	-	3603
Interleukin-17A	IL-17, CTLA8	3605
Interleukin-18 BPa	-	10068
Interleukin-19	-	29949
Interleukin-22	IL-TIF	50616
Interleukin-23	IL-23A, SGRF	51561
Interleukin-24	C49A, FISP, MDA-7, MOB-5, ST16	3627
Interleukin-27	-	246778
Interleukin-31	-	386653
Interleukin-32 $\alpha/\beta/\gamma$	-	9235
Interleukin-33	C9orf26, DVS27, NF-HEV	90865
Interleukin-34	C16orf77	146433
IP-10	CXCL10	3627
I-TAC	CXCL11, SCYB9B	6373
Kallikrein 3	PSA, KLK3	354
Leptin	OB	3952

LIF	-	3976
Lipocalin-2	NGAL, LCN2, Siderocalin	3934
MCP-1	CCL2, MCAF	6347
MCP-3	CCL7, MARC	6354
M-CSF	CSF1	1435
MIF	-	4282
MIG	CXCL9	4283
MIP-1 $\alpha$ /MIP-1 $\beta$	CCL3/CCL4	6348/6351
MIP-3 $\alpha$	CCL20, Exodus-1, LARC	6364
MIP-3 $\beta$	CCL19, ELC	6363
MMP-9	CLG4B, Gelatinase B	4318
Myeloperoxidase	MPO, Lactoperoxidase	4353
Osteopontin	OPN	6696
PDGF-AA	-	5154
PDGF-AB/BB	-	5154/5155
Pentraxin-3	PTX3, TSG-14	5806
PF4	CXCL4	5196
RAGE	-	177
RANTES	CCL5	6352
RBP4	-	5950
Relaxin-2	RLN2, RLXH2	6019
Resistin	ADSF, FIZZ3, RETN	56729
SDF-1 $\alpha$	CXCL12, PBSF	6387
Serpin E1	PAI-I, PAI-1, Nexin	5054
SHBG	ABP	6462
ST2	IL-1 R4, IL1RL1, ST2L	9173
TARC	CCL17	6361
TFF3	ITF, TFI	7033
TfR	CD71, TFR1, TFRC, TRFR	7037
TGF- $\alpha$	TGFA	7039
Thrombospondin-1	THBS1, TSP-1	7057
TNF- $\alpha$	TNFSF1A	7124
uPAR	PLAUR	5329
VEGF	BEGFA	7422
Vitamin D BP	VDB, DBP, VDBP	2638

---

Anlage 2: Ergebnisse der Sekretomanalyse undifferenzierter und 14 Tage hepatogen differenzierter ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen

Name	ABCB5 <sup>+</sup> Stammzellen [% x 750.000 Zellen <sup>-1</sup> ]							
	undifferenziert				14 Tage hepatogen differenziert			
Angiogenin	23,7	32,6	16,8	6,5	15,9	17,7	19,5	21,5
Chitinase 3-like 1	2,2	1,6	0,6	-0,8	18,3	19,8	20,2	25,2
Dickkopf-1	26,9	44,8	32,4	36,8	0,9	-0,5	3,0	3,0
DPP4	0,2	0,7	1,0	0,9	4,6	0,6	7,5	8,1
EMMPRIN	12,6	13,8	8,0	3,2	2,9	0,5	8,2	6,8
ENA-78	25,1	2,1	36,0	0,1	11,5	6,9	20,8	5,8
GDF-15	1,3	2,4	2,1	0,5	9,7	8,7	17,2	12,6
GRO- $\alpha$	2,1	-0,3	2,1	-0,1	16,4	6,1	20,7	19,2
HGF	0,8	0,3	0,9	-2,3	17,8	18,8	20,0	25,1
IGFBP-2	-1,2	-1,2	-3,4	-3,7	10,6	10,0	18,9	8,9
Interferon- $\gamma$	3,0	5,0	9,7	7,6	2,6	1,4	9,0	3,1
Interleukin-8	25,5	10,2	27,9	17,3	9,6	4,5	19,4	12,7
Interleukin-17A	8,2	13,1	9,1	7,3	7,4	2,4	10,0	5,1
MCP-1	2,7	2,2	3,0	1,1	18,7	18,1	19,2	22,9
MIF	24,3	37,5	24,6	16,8	14,8	6,9	19,7	20,5
Pentraxin-3	1,6	7,5	10,4	6,7	12,9	8,0	20,2	23,8
SDF-1 $\alpha$	10,3	34,9	11,1	2,8	8,8	6,0	19,2	21,7
Serpin E1	23,2	39,8	32,0	37,6	15,8	18,2	17,1	23,6
Thrombospondin-1	23,0	39,8	17,8	15,4	3,9	2,9	11,8	11,5
uPAR	10,5	14,6	13,8	6,4	1,1	0,5	2,9	2,4
VCAM-1	0,0	-0,9	0,7	-0,6	7,0	3,7	17,2	3,8

Einzelwerte der Sekretomanalyse als relative Lichtintensität [% x 750.000 Zellen<sup>-1</sup>]. Als Schwellenwert wurde eine relative Lichtintensität von 5 % gewählt.

Anlage 3: Assoziierte KEGG Signalwege, p-Wert der Signifikanzen sowie involvierte und nicht involvierte Zytokine der Signalweganalyse mittels *STRING* Datenbank von undifferenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen.

undifferenzierte ABCB5 <sup>+</sup> Stammzellen			
KEGG Signalwege	p-Wert	Involvierte Zytokine (Entrez Gene ID)	Nicht involvierte Zytokine (Entrez Gene ID)
Rheumatoide Arthritis	3,96 x 10 <sup>-7</sup>	ENA-78 (6374)	
		Interleukin-8 (3576)	
		Interleukin-17A (3605)	
		SDF-1α (6387)	
		Interferon-γ (3458)	
Zytokin-Zytokin Rezeptorinteraktion	5,42 x 10 <sup>-5</sup>	ENA-78 (6374)	
		Interleukin-8 (3576)	
		Interleukin-17A (3605)	
		SDF-1α (6387)	
		Interferon-γ (3458)	
Malaria	2,87 x 10 <sup>-4</sup>	Thrombospondin-1 (7057)	
		Interleukin-8 (3576)	Angiogenin (283)
		Interferon-γ (3458)	Dickkopf-1 (22943)
Chagas-Krankheit	1,99 x 10 <sup>-3</sup>	Serpin E1 (5054)	EMMPRIN (682)
		Interleukin-8 (3576)	MIF (4282)
		Interferon-γ (3458)	Pentraxin-3 (5806)
Chemokin-Signalweg	9,97 x 10 <sup>-3</sup>	ENA-78 (6374)	
		SDF-1α (6387)	
		Interleukin-8 (3576)	
Blasenkrebs	1,17 x 10 <sup>-2</sup>	Thrombospondin-1 (7057)	
		Interleukin-8 (3576)	
		Serpin E1 (5054)	
p53 Signalweg	2,45 x 10 <sup>-2</sup>	Thrombospondin-1 (7057)	
Komplement- und Koagulationskaskade	2,45 x 10 <sup>-2</sup>	Serpin E1 (5054)	
		uPAR (5329)	
Pertussis	2,45 x 10 <sup>-2</sup>	ENA-78 (6374)	
		Interleukin-8 (3576)	

Chronisch entzündliche Darmerkrankung	2,45 x 10 <sup>-2</sup>	Interleukin-17A (3605) Interferon-γ (3458)
TGF-β Signalweg	2,77 x 10 <sup>-2</sup>	Interferon-γ (3458) Thrombospondin-1 (7057)
Salmonelleninfektion	2,81 x 10 <sup>-2</sup>	Interferon-γ (3458) Interleukin-8 (3576)
NF-κB Signalweg	3,05 x 10 <sup>-2</sup>	Interleukin-8 (3576) ENA-78 (6374)
HIF-1 Signalweg	3,68 x 10 <sup>-2</sup>	Serpin E1 (5054) Interferon-γ (3458)
Amöbiasis	3,68 x 10 <sup>-2</sup>	Interferon-γ (3458) Interleukin-8 (3576)

---

Anlage 4: Assoziierte KEGG Signalwege, p-Wert der Signifikanzen sowie involvierte und nicht involvierte Zytokine der Signalweganalyse mittels *STRING* Datenbank von 14 Tagen hepatogen differenzierten ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen.

differenzierte ABCB5 <sup>+</sup> Stammzellen			
KEGG Signalwege	p-Wert	Involvierte Zytokine (Entrez Gene ID)	Nicht involvierte Zytokine (Entrez Gene ID)
Rheumatoide Arthritis	1,47 x 10 <sup>-8</sup>	ENA-78 (6374)	
		GRO- α (2919)	
		Interleukin-8 (3576)	
		Interleukin-17A (3605)	
		MCP-1 (6347)	
		SDF-1α (6387)	
Malaria	4,0 x 10 <sup>-8</sup>	HGF (3082)	
		Interleukin-8 (3576)	
		MCP-1 (6347)	
		Thrombospondin-1	
		VCAM-1 (7412)	
Zytokin-Zytokin Re- zeptorinteraktion	8,25 x 10 <sup>-8</sup>	ENA-78 (6374)	
		GRO- α (2919)	Angiogenin (283)
		HGF (3082)	Chitinase 3-like 1
		Interleukin-8 (3576)	DPP4 (1803)
		Interleukin-17A (3605)	IGFBP-2 (3485)
		MCP-1 (6347)	MIF (4282)
		SDF-1α (6387)	Pentraxin-3 (5806)
Chemokin-Signalweg	1,92 x 10 <sup>-5</sup>	ENA-78 (6374)	
		GRO-α (2919)	
		Interleukin-8 (3576)	
		MCP-1 (6347)	
		SDF-1α (6387)	
TNF Signalweg	8,83 x 10 <sup>-5</sup>	ENA-78 (6374)	
		GRO-α (2919)	
		MCP-1 (6347)	
		VCAM-1 (7412)	
NOD-like receptor Signalweg	6,15 x 10 <sup>-4</sup>	GRO-α (2919)	
		Interleukin-8 (3576)	
		MCP-1 (6347)	

NF-κB Signalweg	2,05 x 10 <sup>-3</sup>	Interleukin-8 (3576)
		SDF-1α (6387)
		VCAM-1 (7412)
Chagas-Krankheit	2,33 x 10 <sup>-3</sup>	Interleukin-8 (3576)
		MCP-1 (6347)
		Serpin E1 (5054)
Blasenkrebs	1,36 x 10 <sup>-2</sup>	Interleukin-8 (3576)
		Thrombospondin-1 (7057)
Legionellose	2,51 x 10 <sup>-2</sup>	GRO-α (2919)
		Interleukin-8 (3576)
p53 Signalweg	3,32 x 10 <sup>-2</sup>	Serpin E1 (5054)
		Thrombospondin-1 (7057)
Epithelialsignale bei Helicobacter pylori Infektionen	3,32 x 10 <sup>-2</sup>	GRO-α (2919)
		Interleukin-8 (3576)
Pertussis	3,26 x 10 <sup>-2</sup>	ENA-78 (6374)
		Interleukin-8 (3576)
Salmonelleninfektion	4,15 x 10 <sup>-2</sup>	GRO-α (2919)
		Interleukin-8 (3576)



## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

01.11.2017  
.....  
Datum

.....  
Unterschrift

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Lysann Tietze  
Geburtsdatum/ -ort: 04.11.1989, Borna

### Tätigkeiten

seit 01.09.2015      Wissenschaftliche Mitarbeiterin  
Arbeitsgruppe Prof. Dr. rer. nat. Bruno Christ  
Angewandte Molekulare Hepatologie  
Universität Leipzig

### Studium

10.2012 – 11.2014      Martin-Luther-Universität  
                                 *Studium der Ernährungswissenschaften*  
                                 • Abschluss: Master of Science (1,7)  
10.2009 – 08.2012      Martin-Luther-Universität  
                                 *Studium der Ernährungswissenschaften*  
                                 • Abschluss: Bachelor of Science (2,3)  
2008 – 2009              TU Bergakademie Freiberg  
                                 Studium der Angewandten Naturwissenschaften

### Schulbildung

2000 – 2008              Werner-Heisenberg-Gymnasium, Leipzig  
                                 • Abschluss: Fachhochschulreife (1,9)  
1999 – 2000              58. Grundschule, Leipzig  
1996 – 1999              16. Grundschule, Leipzig

01.11.2017  
.....  
Datum

.....  
Unterschrift

## Publikationen

### Vorträge

72. Jahrestagung der DGVS & 11. Herbsttagung der DGAV

#### **Hepatische Transplantation von ABCB5<sup>+</sup> Stammzellen nach partieller Hepatektomie**

Tietze L., Winkler S., Hempel M., Kluth A., Tappenbeck N., Ganss C., Christ B.

### **Danksagung**

Es ist soweit! Nach intensiver Arbeit habe ich meine Dissertation beendet und möchte mich auf diesem Weg bei denjenigen bedanken, die mich bei dieser spannenden Herausforderung begleitet haben.

Bei Herrn Prof. Dr. Bruno Christ möchte ich mich für das interessante Thema bedanken und die Möglichkeit mich zu beweisen. Die wissenschaftlichen Diskussionen werden mir immer in guter Erinnerung bleiben. Ebenso gilt mein Dank der Firma RHEACELL GmbH & Co. KG, ohne die das Projekt nicht möglich gewesen wäre.

Mein Dank gilt auch der gesamten Arbeitsgruppe Angewandte Molekulare Hepatologie, die mir täglich zur Seite stand und mich tatkräftig in jedem Bereich unterstützte. Insbesondere Frau Dr. Sandra Winkler, die mich mit Ihrer wissenschaftlichen Betreuung sicher durch das Projekt geführt hat.

Hervorheben möchte ich vor allem die MTLA Madlen Hempel, die gute Seele der Arbeitsgruppe. Bei kleinen und großen Problemen jeglicher Art war sie für mich da, und leistete oft seelische und moralische Unterstützung bis spät abends.

Der größte Dank von allen gilt meinen Eltern. Seit ich denken kann haben sie mich unterstützt und auf meinem Weg begleitet. In guten und auch schlechten Zeiten zu mir gehalten. Viel über böhmische Dörfer diskutiert und manchmal dabei auch Nerven gelassen. Danke für alles!